台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.63 No.4 2014

Research Articles

259 A DNA Probing System for the Detection of *Cucurbit Chlorotic Yellows Virus*
Cheng-Ping Kuan, Ching-Shan Tseng, Wen-Shiue Chang, Hsin-Der Shih, Ying-Huey Cheng, and Ting-Ching Deng

267 Mating Type Distribution of *Phytophthora palmivora* from Papaya in Taiwan
Pao-Jen Ann, Jyh-Nong Tsai, and Ien-Tien Wang

274 Screening of Chemicals for Control of Seedling Blight of Malabar Chestnut in Taiwan
Lih-Ling Chern, Pao-Jen Ann, Jiunn-Feng Su, Cheng-Wei Yang, Hsing-Chun Tsay, Jyh-Nong Tsai, and Ting-Fang Hsieh

282 Comparative Characterization of Two Isolates of *Broad bean wilt virus* 2 Infecting Yams (*Dioscorea* spp.) in Taiwan
Ting-Chin Deng, Yi-Ting Lin, Chin-Hui Tsai, Jye-Yann Liao, and Ruei-Lung Kao

291 Applications of RFID Technology for Transgenic Crops Biosafety Management
Ching-Shan Tseng, Sen-Ju Chen, Cheng-Ping Kuan, Yuan-Kai Tu, Hang-Wei Chen, and Min-Tze Wu

298 Assessment of the Feasibility in Selecting High-Quality Rice Lines under Organic Cultivation System
Chieh-Wei Kuo, Su-Chen Kuo, Yu-Chia Hsu, and Yong-Pei Wu

307 Expression, Evaluation and Application of Novel Green Fluorescent Protein Genes, *AcGFP* and *ZsGFP*, in Rice
Yi-Wen Wang, Hui-Chen Lai, Hsiao-Ying Hsieh, Chang-Sheng Wang, and Da-Gin Lin

Short Communication

320 Breeding of Peach Cultivar 'Tainung No.4 (Ruby)'
Ien-Chie Wen and Ching-Yi Chang

ISSN 0022-4847

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.63 No.4 2014

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.63 No.4 2014

研究報告

259 應用核酸探針系統檢測瓜類褪綠黃化病毒
關政平、曾清山、張文學、石信德、鄭櫻慧、鄧汀欽

267 台灣木瓜疫病菌配對型之分佈
安寶貞、蔡志濃、王姻婷

274 馬拉巴栗苗木疫病之防治藥劑篩選
陳麗鈴、安寶貞、蘇俊峯、楊正偉、蔡幸君、蔡志濃、謝廷芳

282 台灣山藥上分離的蠶豆萎凋病毒2兩個株系之比較鑑定
鄧汀欽、林羿廷、蔡錦慧、廖吉彥、高瑞隆

291 無線射頻辨識技術在基因轉殖作物生物安全管理之應用
曾清山、陳森車、關政平、杜元凱、陳涵葳、吳明哲

298 以有機栽培模式選育優質水稻新品系可行性之評估
郭介煒、郭素真、許育嘉、吳永培

307 新型綠螢光基因*AcGFP*及*ZsGFP*在水稻之表現、評估與應用
王怡雯、賴慧真、謝曉鶯、王強生、林大鈞

研究簡報

320 「台農4號 (紅玉)」桃之育成
溫英杰、張靜誼

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所

領域主編（按筆劃序）

王強生／中興大學農藝系
申　雍／中興大學土壤環境科學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／農業試驗所
柯文雄／中興大學植物病理學系
侯豐男／中興大學昆蟲學系
郭鴻裕／農業試驗所農業化學組
高景輝／台灣大學農藝學系
陳世銘／台灣大學生物產業機電工程系
陳吉仲／中興大學應用經濟系
陳宗禮／中興大學農藝系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
陳福旗／屏東科技大學農園生產系
黃振文／中興大學植物病理學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／台灣大學園藝暨景觀學系
鄔宏潘／中央研究院植物暨微生物學研究所
曾夢蛟／中興大學園藝系
蔡致榮／農業試驗所
蔡新聲／朝陽科技大學生化科技研究所
歐錫坤／農業試驗所作物組
簡立賢／中興大學應用經濟系
蘇正德／東海大學食品科學系

編輯助理

李妙君／農業試驗所研策小組
吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳相君／農業試驗所研策小組

台灣農業研究

第六十三卷　第三期　　中華民國一〇三年九月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　陳駿季
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042

編印　Airiti Press Inc.
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店 / 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02) 2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場 / 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 63(4):259–266 (2014)
DOI: 10.6156/JTAR/2014.06304.01

應用核酸探針系統檢測瓜類褪綠黃化病毒

關政平[1,*] 曾清山[1] 張文學[2] 石信德[3] 鄭櫻慧[3] 鄧汀欽[4]

摘要

關政平、曾清山、張文學、石信德、鄭櫻慧、鄧汀欽。2014。應用核酸探針系統檢測瓜類褪綠黃化病毒。台灣農業研究 63(4):259–266。

本研究以微珠核酸探針系統應用於瓜類褪綠黃化病毒 (CCYV) 之檢測，並進行田間洋香瓜是否感染 CCYV 之測試。此微珠核酸探針系統之檢測包含可擴增 CCYV 病毒鞘蛋白 (CP) 基因及一組植物葉綠體來源基因 (ndhB)，分別設計一組引子對，進行反轉錄聚合酵素連鎖反應及微珠核酸探針系統反應。微珠核酸探針系統設計上，尚包含專一性探針分別與基因擴增內部之序列核酸雜配結合之序列。利用核酸探針結合螢光染劑 (R-PE) 由冷光檢測分析系統 (LiquiChip) 分析螢光訊號作判讀，結果顯示具有高度專一性靈敏度，較使用傳統 RT-PCR 的靈敏度提高約 100 倍。此法預期將有助於檢測 CCYV 感染的洋香瓜種苗驗證。

關鍵詞：瓜類褪綠黃化病毒 (CCYV)、核酸探針、檢測。

前言

瓜類褪綠黃化病毒 (*Cucurbit chlorotic yellows virus*; CCYV) 為 *Closteroviridae* 科 *Crinivirus* 屬之長絲狀病毒，基因體由兩條正單股 RNA 所組成，分別命名為 RNA1 及 RNA2 (Karasev 2000)。2004 年首次在日本發現洋香瓜受到此病毒之感染，並由後續之研究鑑定被確認其分類地位 (Gyoutoku *et al*. 2009; Okuda *et al*. 2010)。台灣於 2009 年在雲林縣發現洋香瓜 (*Cucumis melo* L.) 受 CCYV 感染，並於 2010 年被證實 (Huang *et al*. 2010)。此病毒可藉煙草粉蝨以半永續性方式傳播，危害多種作物，寄主範圍包括甜瓜 (*Cucumis melo* L.)、胡瓜 (*Cucumis sativus* L.)、南瓜 (*Cucurbita moschata* Duchesne)、西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai.] 等葫蘆科作物 (Gyoutoku *et al*. 2009; Huang *et al*. 2010)。而 2009 年 5 月中旬於台灣雲林縣發現 CCYV 對洋香瓜的感染，繼於 2010 年重創中南部洋香瓜及甜瓜產業，導致瓜農損失慘重。其感染初期於植株葉片產生小型黃斑，病斑逐漸擴大形成綠色嵌紋病徵，影響果實產量與品質。

目前檢測 CCYV 病毒普遍使用的方法包括血清免疫學所發展之酵連抗體免疫標誌法 (Enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) (Kubota *et al*. 2011)、反轉錄聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 法 (Gyoutoku *et al*. 2009) 等。微珠核酸探針系統係一新式檢測技術，結合多重聚合酵素進行鏈鎖反應，由 xMAP 技術之冷光檢測分析系統進行判讀。此檢測可在同一時間同一反應管檢定多重感染病原 (Tayor *et al*. 2001; Dunbar *et al*. 2003; Dunbar 2006)，本研究即在嘗試利用微珠結合專一性核酸探針與螢光染劑標誌鍵結的方式，藉由核酸雜配檢測經由核酸擴增量之 CCYV，未來將可運用此微珠

投稿日期：2013 年 8 月 20 日；接受日期：2014 年 2 月 21 日。
[*] 通訊作者：Pcr123@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

核酸探針系統技術於診斷田間瓜類中是否帶有 CCYV。

材料與方法

病毒來源與保存

ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*)、CMV (*Cucumber mosaic virus*)、PRSV (*Papaya ringspot virus*)、CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*) 病毒株皆為農委會農業試驗所保存，本試驗以汁液摩擦分別接種於矮南瓜 (*Cucurbitapepo* L. var. zucchini) 及藜藜 (*Chenopodium quinoa*) 中，寄主接種試驗分別取呈現嵌紋黃化病斑之洋香瓜葉片組織，以 0.05 M 磷酸緩衝液研磨後接種，取葉片組織以 RT-PCR 檢測是否表現病徵。感染 CCYV 之西瓜及洋香瓜樣品採自台中地區，經由 RT-PCR 鑑定與核苷酸定序確定為 CCYV 病毒後，保存於 -70℃中備用。

引子設計

利用 Primerplex 2.0 (USA) 軟體，對 CCYV 病毒基因及植物核酸序列進行引子設計。以所獲得之引子序列結果，設計出對應之專一性引子 (序列詳如表 1)，供檢測使用。

植物全 RNA 之純化

將植物組織以 TriSolution Reagent Plus (PROTECH，台灣) 試劑組抽取其全量 RNA，步驟參照純化套組所附之使用說明。先秤取 0.1 g 植物組織，加入液態氮後以研缽及缽棒磨成粉末狀，將研磨好的組織粉末移入 1.5 mL 微量離心管中，取 1 mL TriSolution Reagent (Genemark, 台灣) 加入上述離心管中，均勻混合約 15–30 s，均質化的產物於室溫下放置 5 min。每 1 mL 的 TriSolution Reagent (Genemark，台灣) 加入 0.2 mL 的 Chloroform-Isoamyl alcohol (24 : 1) (AMRESCO, USA)，劇烈震盪 15 s 並於室溫放置 2–3 min。進一步處理後於 4℃下離心 (12,000× *g*) 15 min，吸取上層澄清液 (無色水層，大約 0.6 mL 的體積) 至新的離心管，每 1 mL 的 TriSolution Reagent (Genemark，台灣) 加入 0.25 mL Isopropanol 及 0.25 mL PS & PG (Polysaccharides and Proteoglcan) Removal Solution (Genemark，台灣)，混合均勻後置於室溫 10 min。將試驗樣品於 4℃下離心 (12,000× *g*) 10 min (RNA 以白色沉澱物方式沉澱於試管底部)，小心移除上清液，加入 1 mL 75% 酒精以震盪器震盪混均 RNA 沉澱物，再於 4℃下離心 (12,000× *g*) 離心 5 min。移除酒精並將沉澱物進行乾燥 5–10 min。加入 1 倍 RNase-free water 40 μL，用微量分注器反覆混勻，回溶沉澱物於 65℃靜置 20 min。

反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)

反轉錄反應以取待測植物全 RNA 2 μg，加入 0.5 μg oligo $(dT)_{18}$ 及 0.5 μg random hexmer primer，DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 處理水配置 25 μL。以 70℃加熱 5 min 後，迅速置於冰中冷卻，再分別加入 5 μL 之 MMLV RT 5× reaction buffer (Promega, USA)、5 μL 之 10 mM dNTP (40 U μL^{-1}, Promega, USA) 及 1 μL 之 MMLV reverse transcriptase (200 U μL^{-1}, Promega, USA)，置於 42℃水浴中作用 60 min，

表 1.　本試驗所使用之引子與核酸探針。

Table 1.　Primers and probes used in this study.

Primer/probe[z]	Sequence (5'–3')	Position (nt)
CCYV-368-0923-probe (5' modified NH2 C6)	GCCAGGAAACACGAGTCAGA	5432–5452
CCYV-368-0726-F1	CCATCACCAGACGAGTTCAT	5229–5248
CCYV-368-0726-R1 (5'modified Biotin)	GCCGCCAAATCACCATCT	5579–5596
ndHB-476-0726-probe (5' modified NH2 C6)	GAGAAGAACCTATGATTAGCTT	144268–144289
ndHB-476-0726-F1	GCCTTTCATTTGCTTCTCTTC	144090–144110
ndHB-476-0726-R1 (5'modified Biotin)	GCCTCATTAGACCGTACATCT	144545–144565

[z] CCYV: GenBank Accession no. AB523789.1; ndHB: GenBank Accession no. AJ316582.1.

以合成第一股 cDNA。之後取反轉錄產物進行 PCR 反應，於 0.2 mL 微量離心管中分別加入 14 µL 之 ddH_2O、2 µL 反轉錄產物、2.5 µL 10× PCR buffer、2 µL 2.5 mM dNTP、1 µL 0.4 µM CCYV 正向引子 (CCYV-368-0726-F1)、1 µL 0.4 µM CCYV 反向引子 (CCYY-368-0726-R1)，1 uL 0.4 µM hdhb-476-0726F 正向引子，1 uL 0.4 µM hdhb-476-0726R 反向引子及 0.5 µL 2 U μL^{-1} Taq DNA polymerase (Protech，台灣)。之後以 1,000× *g*) 離心 10 s，接著進行 PCR 反應。其 program 如下：94℃、5 min 再 94℃、30 s，57℃、30 s，72℃、30 s (30 cycle) 再 72℃、7 min。最後取 10 µL 之 PCR 產物進行 1.5% 膠體電泳分析。

CCYV 核酸片段選殖與序列分析

待測之植物葉片以 CCYV 分離株設計對應之 RNA2 cp 基因之專一性引子對 CCYV-368-0726-F1、CCYV-368-0726-R1 進行 RT-PCR 反應後。將增幅之產物使用回收套組 (IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare, UK) 回收純化之 DNA 利用 TA 轉殖載體構築於 pGEM-T Easy vector (Promega, USA)，質體 DNA 以 NanoVue spectrophotometer 定量核酸濃度 (GE Healthcare, USA) 作為試驗正反應組用。

微珠核酸探針鍵結

本研究所使用之探針及引子對序列詳如表 1。將已設計之 CCYV 病毒序列之目標區域，反向引子 (CCYV-368-0726-R1) 之 5’ 端標定 biotin；並從目標區域設計探針 (大小約 25–40 mers) 再將探針 5’ 端經胺基 (Amine) 修飾 (基龍米克斯公司，台灣)，以利與微珠上之胺基進行鍵結。微珠探針之作用流程詳如圖 1 所示，將微珠震盪均勻後並經超音波震盪各 30 s 後取 100 µL (1.25 × 10^6 微珠)，離心 (14,000× *g*) 2 min 去除上清液，加入 50 µL 之 0.1 µM MES [2 (N-Morpholino) ethanesulfonic acid] (pH 4.5)，震盪 20 s。加入 2 µL

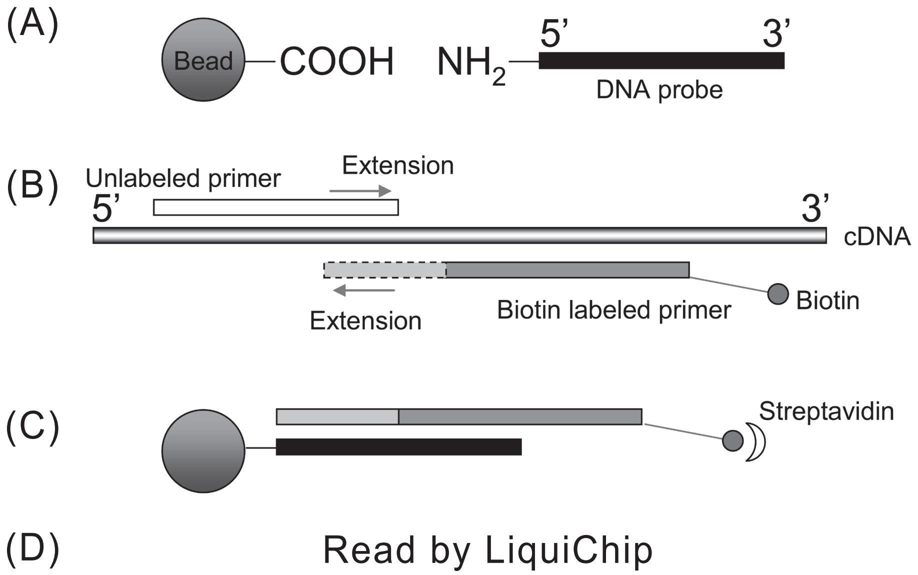

圖 1. 微珠核酸探針系統作用流程圖。(A) 微珠與專一性病毒互補之序列進行黏合；(B) 反轉錄反應及核酸擴增反應將 biotin 帶入擴增之產物中 (使用引子反向之引子帶有 biotin)；(C) 進行核酸雜配反應，並加入 streptavidin 作用；(D) 以冷光儀進行螢光偵測。

Fig. 1. Flow chart of bead-based DNA probing system. (A) The complementary anti-tag sequence coupled to a bead set; (B) Amplification products of biotin at 5’ end side; (C) Hybridization process with streptavdin added; and (D) Read by the LiquiChip system.

混合液 [0.2 nanomole CCYV-368-0923-probe 與 66 號微珠 (直徑 5.3 nm 大小)；ndHB-476-0726-probe 與 30 號微珠 Beads (直徑 5.3 nm 大小)；biotinylated probe-CCYV；5’-biotin-GCCGCCAAATCACCATCT-3’；biotinylated probe-ndHB；5’-biotin-GCCTCATTAGAC-CGTACATCT-3’]，震盪混合，配 10 mg mL^{-1} EDC [1-ethyl-3-(3dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride] (10 mg EDC dissolved in 1 mL ddH_2O)，加入 2.5 µL 10 mg mL^{-1} EDC 震盪混合。在室溫下及避光條件下，震盪 30 min。加入 1 m L 之 0.02% Tween-20 混合後，離心 (14,000× *g*) 2 min，去除上清液體後加入 1 mL 之 0.1% SDS，震盪混合，離心 (14,000× *g*) 2 min，去除上清液後加入 100 µL TE buffer，避光保存於 4℃。

核酸雜配反應與螢光偵測

PCR 產物取 5 µL，加入 1.5× TMAC (Tetramethylammonium chloride solution) 33 µL，各加入帶有微珠之探針 (濃度則達 2,500 beads 數量)，之後補 TE buffer 至 50 µL，放於 PCR 儀，Verti thermal cycler (Perkin Elmer-Applied Biosystems, USA) 儀內加熱 95℃、5 min，50℃、15–30 min (核酸雜配)，(離心 10,000× *g*) 5 min。去除上清液，加入 75 µL 2–4 µg mL^{-1} streptavidin-R-phycoerythrin 已先溶於 1× TMAC，於 50℃下反應 15 min，之後放入冷光儀 LiquiChip 200 (Qiagen, Germany)，觀察反應讀值並判讀結果。

專一性及靈敏度試驗

檢測 CCYV 專一性試驗，待測之病毒包括 CCYV (3 個病毒分離株)、CMV、PRSV、CGMMV、ZYMV、健康洋香瓜、南瓜、西瓜與無菌水，經由上述的 RT-PCR 反應後，使用微珠探針系統與冷光儀進行分析進行 3 重複及 2 次反應。為了測試核酸雜配的靈敏度，感染 CCYV 洋香瓜之全量 RNA 以無菌水進行 10 倍系列稀釋 (50 ng mL^{-1} 至 5 ag mL^{-1}) 做為 RT-PCR (或 PCR) 模板。RT-PCR (或 PCR) 終產物再與微珠探針雜配，並以冷光儀測試判讀以評估靈敏度，且與 RT-PCR 的靈敏度做比較。所有反應皆 3 重複，並且進行 2 次反應，結果經 Excel 統計圖表方析。

田間 CCYV 檢測

採集田間栽培之西瓜及洋香瓜材料，取葉片組織約 0.1 g 進行全量 RNA 之萃取純化，步驟依照前述材料與方法進行，RT-PCR 及反應結果置於冷光儀 LiquiChip 200 (Qiagen, Germany) 進行檢測。

結果

微珠核酸探針之專一性試驗

本試驗使用 RT-PCR 法增幅感染 CCYV 之植物組織之核酸抽出物，產生 368 bp 之 CCYV 專一性核酸片段產物，以及 476 bp 植物基因片段 (ndhB) 產物 (做為內控試驗用)。增幅之核酸產物與微珠核酸探針做雜配反應，利用冷光檢測儀觀察微珠探針分佈位置，經檢測顯示僅與瓜類 CCYV 反應，而對 CMV、ZYMV、PRSV 及 CGMMV 等其他類病毒及健康南瓜、洋香瓜或西瓜植物與無菌水做負反應對照組皆不反應，同時顯示有一植物基因片段 (ndhB) 形成，健康南瓜、洋香瓜及南瓜皆對 ndhB 探針產生反應，確認試驗的全 RNA 抽取無誤 (圖 2)。

靈敏度試驗

抽取感染 CCYV 之洋香瓜全 RNA 作為試驗用之核酸模板，核酸濃度經系列 10 倍稀釋不同濃度進行 RT-PCR 及磁珠核酸探針系統搭配核酸雜配反應 (冷光儀分析)，並同時比較 RT-PCR 法及冷光儀 2 種檢測法。結果顯示，以 RT-PCR 法經電泳分析，出現 368 bp CCYV 專一性產物及 476 bp 之專一性 ndhB 產物，並可測到稀釋倍數至 10^{-3}，相當可檢測至 50 pg RNA 量，使用冷光儀可以測到稀釋倍數至 10^{-5}，相當於 0.5 pg CCYV 量。由此顯示，靈敏度微珠核酸探針系統搭配冷光儀之靈敏度較 RT-PCR 法提高約 100 倍 (圖 3)。

田間病毒檢測試驗

利用 RT-PCR 法對田間疑似感染之洋香

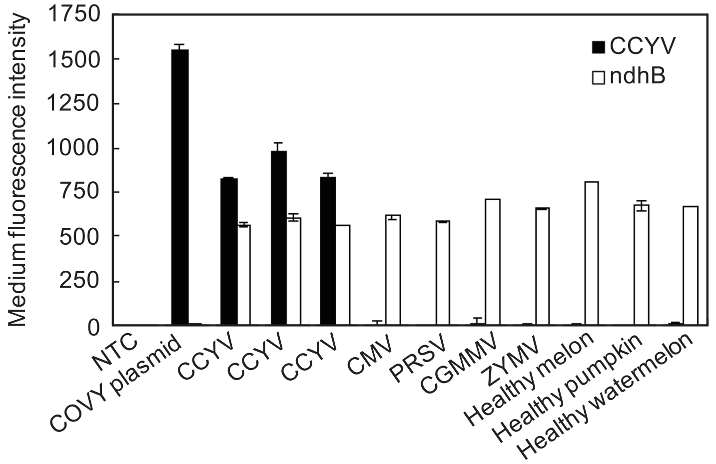

圖 2. *Cucurbit chlorotic yellows virus* 專一性試驗，核酸探針系統檢測病毒包括 *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV)、*Cucumber mosaic virus* (CMV)、*Papaya ringspot virus* (PRSV)、*Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)、*Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)、健康南瓜、洋香瓜及西瓜。所有的探針試驗皆含 2 種探針同時反應，反應背景值已扣除。

Fig. 2. Probe specificity tests with target and non-target DNA, including *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), as well as healthy squash, melon and watermelon. All probes were tested in a multiplex format (2 plex assay). The background signal was subtracted.NTC: no template control.

瓜樣品進行檢測，結果顯示 15 株洋香瓜葉片中以 RT-PCR 法可檢測到 4 株具有 CCYV，使用微珠核酸探針系統則顯示有 6 株可測到 CCYV (結果未顯示)。由結果可知，此方法可在洋香瓜中檢測出 CCYV。將擴增的 368 bp RT-PCR 產物經由瓊脂回收純化進行核苷酸定序，確屬於 CCYV 之鞘蛋白基因的部分片段，序列的相同度均與 CCYV (GeneBank acc no AB523789.1) 達 98% (結果未顯示)。因此，顯示本研究所應用之磁珠核酸探針檢測系統對 CCYV 檢測結果的可靠性。

討論

目前使用微珠核酸探針系統應用常見於各種病原菌的檢測 (Tayor *et al*. 2001; Dunbar *et al*. 2003)，惟在 *Crinivirus* 的檢測上仍然缺乏。使用傳統 PCR 法僅增幅出特定片段，而使用微珠核酸探針系統，因經由專一性探針可與增幅之特定片段雜配反應，具有較佳之專一性確認。此外，使用微珠核酸探針系統具有可同時檢測 96 個樣品數之優點。然而，此法的主要缺點是反應需要具有熟悉操作試驗的人員，且需要搭配特定儀器才能進行反應與分析。本研究結果顯示，當 CCYV 探針附加微珠再經雜配反應與目標 DNA 片段結合時，所產生之螢光訊號強度可進一步確認 PCR 擴增之產物。多重微珠核酸探針檢測病原特異性分析技術，有利於同時檢測多種病毒於同一反應管中 (Dunbar *et al*. 2003; Dunbar 2006)。此系統應用上另設計一內部植物控制引子對做為負對照組，可同時檢測多種植物病毒存在量，本研究所使用之冷光儀可以同時檢測瓜類 CCYV 病毒，並加入一植物基因做為反應之內控試驗 (internal control)。又此技術具有高通量快速檢測之優點 (Dunbar*et al*. 2003)，反應時間約 5–6 h。反應訊號強度與引子探針設計是否良好有關。此外，RT-PCR 是否最佳化與核酸雜配條件 (hybridization condition) 等，可能也會影響反應結果。本研究所使用之引子 CCYV368-0726F1/R1，ndHB 476-0726F1/R1 混合於檢測 CCYV 及檢測植物基因，均具有專一性並於磁珠核酸探針雜配法中優於 RT-PCR 之靈敏度。

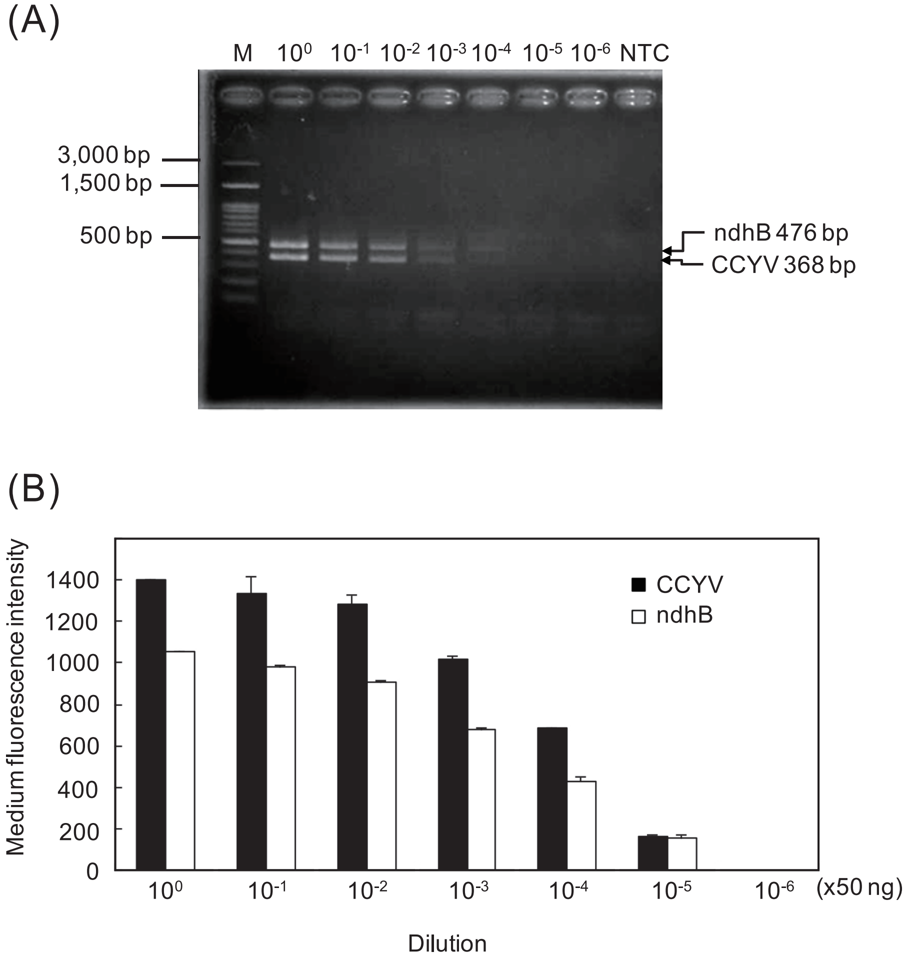

圖 3.　靈敏度試驗。(A) 感染 *Cucurbit chlorotic yellows virus* 之洋香瓜抽取 total RNA 經 10 倍系列稀釋後，以 RT-PCR 反應並經過電泳分析結果可檢測至 10^{-4} ng RNA 稀釋液；(B) 以微珠核酸探針系統法檢測，可檢測至 10^{-5} ng RNA 稀釋液。

Fig. 3.　Minimal detection limit (sensitivity) of CCYV by RT-PCR (A) and LiquiChip detection system (B). Samples were run in 3 duplicates, and the experiment was run twice. NTC: no template control.

CCYV 已有利用血清學法使用 ELISA 鑑定病毒之方法 (Kubota *et al*. 2011)，但 Kubo-ta*et al*. 認為 CCYV 病毒不易由感染植物中獲得足夠純化病毒蛋白做為動物免疫抗原以生產抗血清，主因是病毒在植物體中含量偏低 (Kubota *et al*. 2011)。本研究以傳統的 RT-PCR 法檢測 CCYV，再搭配微珠核酸探針技術後，可提高檢測靈敏度約達 100 倍。在 RNA 濃度非常低的情形下，仍可使用冷光儀提高偵測 CCYV 病毒之效益。

田間 CCYV 檢測，亦分別在疑似感染 CCYV 之洋香瓜樣本中；以 RT-PCR 法及微珠核酸探針系統技術皆可檢測出 CCYV 病毒，但試驗結果顯示 15 株洋香瓜中使用 RT-PCR 檢測出 4 株為陽性反應，使用微珠核酸探針技術則有 6 株被檢出。由此可知，有些葉片可能病毒量較低，使用 RT-PCR 法無法測出，但使用微珠核酸探針技術則有可能提高增幅病毒效果。因此，微珠核酸探針系統技術除具高度特異性外，亦有良好敏感性。隨著瓜類種植面積

不斷擴大，CCYV 所造成的危害也陸續出現，本研究結合微珠核酸探針系統的發展所建立之 CCYV 的檢測方法，高靈敏度檢測病毒之優點，對未來監測田間病害的發生，進而預防病害損失及在抗病篩選、病害流行預測等將有所助益。

引用文獻

Dunbar, S. A. 2006. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. Clin. Chim. Acta 363:71–82.

Dunbar, S. A., C. A. Vander Zee, K. G. Oliver, K. L. Karem, and J. W. Jacobson. 2003. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. J. Microbiol. Methods 53:245–252.

Gyoutoku, Y., S. Okazaki, A. Furuta, T. Etoh, M. Mizobe, K. Kuno, S. Hayashida, and M. Okuda. 2009. Chlorotic yellows disease of melon caused by *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new crinivirus. Jpn. J. Phytopathol. 75:109–111.

Huang, L. H., H. H. Tseng, J. T. Li, and T. C. Chen. 2010. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting Cucurbits in Taiwan. Plant Dis. 94:1168.

Karasev, A. V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. Annu. Rev. Phytopathol. 38:293–324.

Kubota, K., T. Usugi, and S. Tsuda. 2011. Production of antiserum and immunodetection of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a novel whitefly-transmitted crinivirus. J. Gen. Plant Pathol. 77:116–120.

Okuda, M., S. Okazaki, S. Yamasaki, S. Oluda, and M. Sugiyama. 2010. Host range and complete genome sequence of Cucurbit chlorotic yellows virus, a new member of the genus Crinivirus. Phytopathology 100:560–566.

Taylor, J. D., D. Briley, Q. Nguyen, K. Long, M. A. Iannone, M. S. Li, F. Ye, A. Afshari, E. Lai, M. Wagner, J. Chen, and M. P. Weiner. 2001. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. Biotechniques 30:661–666.

A DNA Probing System for the Detection of *Cucurbit Chlorotic Yellows Virus*

Cheng-Ping Kuan[1,*], Ching-Shan Tseng[1], Wen-Shiue Chang[2], Hsin-Der Shih[3], Ying-Huey Cheng[3], and Ting-Ching Deng[4]

Abstract

Kuan, C. P., C. S. Tseng, W. S. Chang, H. D. Shih, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2014. A DNA Probing system for the detection of C*ucurbit chlorotic yellows virus*. J. Taiwan Agric. Res. 63(4):259–266.

In this paper, a PCR assay coupled with microspheres to rapidly screen field samples for *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) survey on melons was developed. The RT-PCR was designed to have the same binding sites for the forward and reverse primers of the CCYV viral coat protein (CP) gene as the target amplicon, but it had a unique internal sequence used for the probe site. The amplification of the CCYV viral RNA and the detection by LiquiChip were monitored with two different fluorescent probes in a multiplex format, one specific for the CCYV CP gene and the other for the plant chloroplast source gene, ndhB. The detection sensitivity of multiplex RT-PCR by LiquiChip was 100 times higher than only detection by RT-PCR for CCYV. The hybridized beads were processed and analyzed on LiquidChip instrument, which detected the presence of CCYV RNA and quantity of each PCR product from melon samples. Therefore, it may have great advantage to the certification program of melons.

Key words: *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), Nucleic acid probe, Detection.

Received: August 20, 2013; Accepted: February 21, 2014.
[*] Correspondig author, e-mail: Pcr123@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Associate Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 63(4):267–273 (2014)
DOI: 10.6156/JTAR/2014.06304.02

台灣木瓜疫病菌配對型之分佈

安寶貞[1,*] 蔡志濃[2] 王姻婷[3]

摘要

安寶貞、蔡志濃、王姻婷。2014。台灣木瓜疫病菌配對型之分佈。台灣農業研究 63(4):267–273。

自 1977 年至 2011 年於 13 縣市 39 地區之 106 處木瓜果園，採集罹病果實及根、莖、葉組織，共計分離到 278 株疫病菌。經鑑定所有菌株均為 *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler，其中屬於 A^1 配對型的菌株有 262 株，A^2 配對型的僅有 16 菌株。如果以果園來區分，106 個果園中，僅有 2 處果園完全出現 A^2 菌株，有 101 處果園完全出現 A^1 菌株，有 3 處果園同時出現 A^1 與 A^2 菌株，但 A^1 菌株為優勢，A^2 菌株在各果園僅有 1 株。如果將木瓜菌株分離的年代區隔成 3 個不同時段，包括 1977–1980 (早年)、1988–2000 (中年) 及 2001–2011 (近年)，則 1980 年以前分離的 13 個菌株均為 A2 配對型；1988–2000 年分離的 164 個菌株中 161 個菌株均為 A^1 配對型，僅有 3 菌株為 A^2 配對型；2000 年以後 (2001–2011) 分離的 101 個菌株均為 A^1 配對型。資料顯示，A^1 菌株為目前台灣木瓜園內的絕對優勢種。

關鍵詞：木瓜、疫病菌、*Phytophthora palmivora*、配對型。

前言

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 又稱木瓜，是番木瓜科 (Caricaceae) 水果。木瓜原產於熱帶美洲，目前在台灣的栽培面積約 2,600 ha (102 年農業統計年報)，為台灣重要的經濟果樹之一。依據台灣植物病害名彙記載，為害木瓜的病原菌有許多種 (Hsu *et al*. 2002)，疫病菌 (*Phytophthora* spp.) 為其中之一。Huang *et al*. (1976) 研究指出為害台灣木瓜的疫病菌為 *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler，但菌株間無法配對產生卵孢子，因此亦無法知曉木瓜疫病菌的配對型 (mating type)。本研究室多年來收集木瓜疫病菌株，並測定該等菌株的配對型，本研究將報告我國木瓜疫病菌的種類及配對型的變異。

材料與方法

病菌之分離與保存

採集罹患疫病的木瓜發病組織 (包括果實、根系及幼苗全株)，先將罹病組織洗淨、以紙巾瀝乾水分。將罹病果實與幼苗葉片上病斑與健康區間之組織切成 7 mm × 7 mm 小塊，罹病根系或幼苗莖部組織切成 10 mm 長小片段，經 0.5% NaClO 溶液表面消毒 30 s，再以紙巾吸乾，移置於分離疫病菌之 5% CVA (Clarified V-8 juice agar) 半選擇性培養基 (Ko *et al*. 1978) 上。半選擇性培養基的製作為先配製5% CVA [5% Clarified V-8 juice agar；將5% V-8 vegetable juice (Campbell, New Jersey, USA) 與 0.2% $CaCO_3$ 混合後，經 1,500 rpm 低速離心 5 min，取上層液，再加入 2% Bacto agar (Difco, Maryland, USA)，於滅菌後加入

投稿日期：2014 年 7 月 31 日；接受日期：2014 年 8 月 20 日。
[*] 通訊作者：pjann@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

ampicillin 100 mg L^{-1}、PCNB (Pentachloronitrobenzene) 10 mg L^{-1} 及 mycostatin 50 mg L^{-1}。經 1–2 d 後，即可見菌絲陸續自罹病組織長出。切取前端菌絲，接種於新配製之 5% VA (5% V-8 vegetable juice agar，將 5% V-8 vegetable juice 與 0.02% $CaCO_3$ 混合後，加入 2% Bacto agar 後滅菌) 上。分離出之疫病菌 (表 1) 經單孢囊 (sporangia) 或游走子 (zoospores) 分離後，再移置於 5% VA 上，在 24℃下無光照培養 3–5 d，切取前端菌絲塊 (10 mm × 5 mm × 5 mm)，保存於 20–24℃下含無菌水之試管中 (Boesewinkel 1976)。

菌落形態觀察

將供試菌株的新鮮菌絲塊接種於含有 5% CVA 與 PDA (馬鈴薯葡萄糖瓊脂，每公升培養基中含有 200 g 煮沸過、切碎、未去皮的馬鈴薯塊莖濾液、20 g 葡萄糖、2% Bacto agar) 的培養皿 (直徑 9 cm) 中，於室溫 (24–28℃) 下培養 4–6 d。

疫病菌之產孢

將分離之木瓜新鮮菌絲塊先在 5% VA 上於 24℃下培養 3–5 d，將先端的菌絲切成 5 mm × 5 mm × 3 mm 小塊，移植於含有 20 mL 無菌水的玻璃培養皿 (直徑 6 cm, Pyrex, New York, USA) 中，再經光照 1–3 d，觀察有無孢囊產生。量取孢囊大小時，則依 Hwang *et al*. (1975) 研發的方法，讓供試菌株產生大量孢囊。孢囊長出後，在顯微鏡下觀察與測量其大小，每菌株測量 100 個孢囊。此外，檢視培養基，觀察有無厚膜孢子 (chlamydospores) 產生。

配對型的測定

將供試菌株的新鮮菌絲塊 (在 5% VA 上無光照培養 3–5 d) 切成 2 mm × 2 mm × 2 mm 小塊，移入含有 10 mL 新配製 10% VA 之培養皿 (直徑 6 cm, Pyrex) 的中央，每皿放置單一菌株之菌絲塊 3–4 塊，在 24℃無光照培養 6–10 d，再在顯微鏡下鏡檢有無卵孢子 (oospores) 產生，以判斷供試菌株是否屬同絲型 (homothallic)。如果單一菌株不會形成卵孢子，再將供試菌株分別與標準菌株 [*Phytophthora* nicotianae Breda de Haan (= *Phytophthora* parasitica Dastur)] p991 (A^1) 和 p731 (A^2) 對峙培養，以測定供試菌株的配對型。配對時，每皿各放置測試菌株與標準菌株各 4 塊，兩者相距 1 cm，置於無光照環境下培養 6–10 d，再在顯微鏡下觀察有無卵孢子形成。可與 A^1 配對產生卵孢子者為 A^2 型；可與 A^2 配對形成卵孢子者為 A^1 型。

核醣體內轉錄區間 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 的 DNA 定序

DNA 抽取：將生長 3–5 d 的新鮮菌絲塊 (ca. 3 mm × 3 mm × 2 mm)，接種於覆蓋一層玻璃紙的 5% VA 培養皿的中央，在 24℃無光照培養 5–7 d 後，刮取玻璃紙上的菌絲，經無菌水漂洗後冷凍乾燥。將約 20 mg 冷凍乾燥的疫病菌菌絲加入少許液態氮後磨成粉末。依照製造商的操作步驟，利用 Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Taichung, Taiwan) 抽取疫病菌的 DNA。

PCR 聚合酶連鎖反應與 DNA 定序：核醣體內轉錄區間 [ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions] 的 DNA 序列，包括 ITS1、ITS2、5.8S rRNA 基因，及部份 18S rRNA 與 28S rRNA 基因之序列，以供試菌株 genomic DNA 為模板 (templates)，利用通用引子對 (the universal primers) ITS5 與 ITS4 (White *et al*. 1990) 進行 PCR，將 PCR 增幅產物委託昕穎生物科技公司 (Seeing Bioscience, Taipei, Taiwan) 直接進行定序，使用的引子對包括 ITS5、ITS4、5.8S2-1 (5’-TCGCACATCGATGAAGAACG-3’) 及 5.8S2-2 (5’-TACGGACACTGATACAGGCAT-3’)。

DNA 序列的接合 (assembly) 與 GenBank 資料庫搜尋：利用 Vector NTI 軟體 (Vector NTI software v. 10.0，InforMax, California, USA) 整理上述獲得的 DNA 序列後獲得完整的 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 區間序列，而多型部位 (polymorphic sites) 則依照 IUPAC ambiguity codes 予以標示。定序後的疫病菌 DNA 序列上載到 NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

網站，利用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 軟體從 GenBank 資料庫尋找序列最相近的疫病菌種類 (species) 與菌株。此外，並將具代表性的疫病菌 DNA 序列登錄在 GenBank 資料庫。

疫病菌之鑑定

形態、生理特性比較：依據供試菌株之菌落形態、孢囊形態與大小、卵孢子與厚膜孢子 (chlamydospores) 形成與否、再依疫病菌之分類文獻 (Waterhouse 1963, 1970; Stamp *et al*. 1990)，予以鑑定之。同時上 NCBI 網站，比對核醣體內轉錄區間 (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) 的 DNA 序列，尋找最相近的疫病菌與菌株。

結果

木瓜疫病菌之分離

自 1977 年至 2011 年共計採集 13 縣市 39 地區 106 處罹病木瓜果園的罹病果實與根莖組織，共計分離到 278 株疫病菌 (表 1)，分離地點包括桃園 (楊梅)、新竹 (竹東)、苗栗 (南庄、頭屋)、南投 (南投市、集集、名間、埔里)、台中 (台中市、霧峰)、彰化 (二水)、雲林 (林內)、嘉義 (嘉義市、中埔、竹崎、民雄、太保、新港)、台南 (六甲、鹽水、柳營、大內、玉井)、高雄 (鳳山、大樹、旗山、六龜)、屏東 (高樹、鹽埔、里港、新園、麟洛)、台東 (台東市、鹿野、太麻里、關山、卑南) 及花蓮 (瑞穗、玉里) 等。

木瓜疫病菌之菌落與孢囊形態觀察

所分離到的 278 株木瓜疫病菌菌株，均經過菌落形態與孢囊形態觀察，這些菌株在 5% CVA 生長時的菌落形態略具放射狀，在 PDA 生長時則無特殊花紋，或呈現不明顯花紋，產生少許氣生菌絲。所有菌株，在光照情形下，在固態 5% VA 上會形成少許孢囊；但當菌絲塊移入無菌水中光照時或以礦物鹽液漂洗處理 (Hwang *et al*. 1975) 後，則可形成大量孢囊。孢囊著生為單假軸式，每一孢囊梗可著生 5–12 個孢囊。孢囊為橢圓形、長橢圓形、檸檬形或卵圓形，兩側大致對稱；孢囊亦具顯著的半球型乳突 (papilla)。孢囊易脫落，脫落率 100%，脫落的孢囊具甚短的孢囊柄 (pedicels)，長度 0.5–5 μm。測定 14 株供試菌株的孢囊大小，平均為 40.5–54.7 μm × 27.2–33.9 μm，孢囊長寬比值平均為 1.44–1.76 (表 2)。所有菌株在無光照培養情形下均可形成厚膜孢子。

配對型的測定

所有 278 株木瓜菌株在單獨培養時，均不會形成卵孢子，故非同絲型。但絕大部分菌株 (262 株) 與標準菌株 (*P. nicotianae*) p731 (A^2) 對峙培養時可以形成卵孢子，為 A^1 配對型；僅有少數菌株 (16 株) 與標準菌株 p991 (A^1) 對峙培養時可以形成卵孢子，為 A^2 配對型。如果以果園來區分，106 個果園中，僅有 2 處果園完全出現 A^2 菌株，有 101 處果園完全出現 A^1 菌株，有 3 處果園同時出現 A^1 與 A^2 菌株，但 A^1 菌株為優勢，A^2 菌株在各果園僅有一株。如果將木瓜菌株分離的年代區隔成三個不同時段，包括 1977–1980 (早年)、1988–2000 (中年) 及 2001–2011 (近年)；則 1980 年以前分離的 13 個菌株均為 A^2 配對型；1988–2000 年分離的 164 個菌株中 161 個菌株均為 A^1 配對型，僅有 3 菌株為 A^2 配對型；2000 年以後 (2001–2011) 分離的 101 個菌株均為 A^1 配對型，顯示 A^1 菌株為目前台灣木瓜園內的絕對優勢種。

台灣木瓜疫病 *Phytophthora* 之傳統鑑定

經比對 Waterhouse (1963, 1970)、Stamp *et al*. (1990) 的分類文獻，由菌落形態、孢囊著生方式與形態、孢囊脫落性等特徵、可以形成厚膜孢子及菌絲生長溫度 (本試驗未顯示) 等特性，顯示本試驗中自木瓜罹病組織分離得到的疫病菌，無論為 A^1 或 A^2 菌株均屬於 Waterhouse 分類群 group II，鑑定為 *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler，且均為典型菌株 (typical type)。

核醣體內轉錄區間 ITS1-5.8S rDNA-ITS2

分析從台灣木瓜疫病菌分離得到的 8 個代表性的疫病菌菌株 (包括 7 個 A^1 菌株及 1 個 A^2 菌株) 的 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (簡稱 ITS)

表 1. 台灣木瓜園內疫病菌 *Phytophthora palmivora* 之分離情形。

Table 1. A list of *Phytophthora palmivora* isolates obtained from papaya orchards in Taiwan from 1977 to 2011.

Isolate no.	Mating type	No. orchards	Location	Year
7701–06	6 A^2	1	Chiayi city	1977
8001–07	7 A^2	1	Zhongpu, Chiayi	1980
8823, 8824–25, 8826–27, 8875	6 A^1	4	Chiayi city; Zhuqi, Chiayi; Liujia, Tainan; Yanshui, Tainan	1988
8927–30, 8980–84, 8985–89, 8990–93, 8994, 8995–97, 8998–100, 89101, 89102–104, 89105, 89106 89108–109, 89110, 89111, 89113, 89118–20, 89121–23, 89124, 89125–26, 89127, 89132–135, 89136–38, 89139–40, 89141–42, 89143–44, 89145, 89146–49, 89150–51, 89152, 89155–56, 89157, 89158–60, 89161–62, 89163–66, 89167–70, 89171, 89172–74, 89175–76, 89177, 89178, 89179, 89183–84, 89185, 89186–88, 89189–92	95 A1 : $3A^2$	44	Nanchuang, Miaoli; Jiji, Nantou; Linnei, Yunlin; Liuying, Tainan; Minsyong, Chiayi; Taibao, Chiayi; Singang, Chiayi; Chiayi city; Yanshui, Tainan; Danei, Tainan; Dashu, Kaohsiung; Neiman, Kaohsiung; Gaoshu, Pintung; Yanpu, Pintung; Ligang, Pintung; Sinyuan, Pintung	1989
90069–72, 90073–75, 90076–79, 90080–83, 90084, 90087, 90088, 90089, 90090–91, 90092, 90093–95, 90096–98,	$30A^1$	12	Taitung city; Luye, Taitung; Taimali, Taitung; Guanshan, Taitung; Rueisuei, Hualien; Yuli, Hualien	1990
92182–83	$2A^1$	1	Minsyong, Chiayi	1992
96062–67, 96068–69, 96070–73, 96074, 96075–78, 96101–102, 96103–104	$20A^1$	7	Yangmei, Taoyuan; Zhudong, Hsinchu; Mingjian, Nantou; Nantou city; Erhshui, Changhua	1996
97040–41, 97071–74	$6A^1$	2	Mingjian, Nantou; Nantou city	1997
98108–109	$2A^1$	1	Nantou city	1998
201162–65	$4A^1$	1	Nantou city	2001
204217–18	$2A^1$	1	Touwu, Miaoli	2004
206271–74, 206276–79, 206280–83, 206284–87, 206288–91, 206292–95, 206296–96, 206309–10, 206311–13, 206313–15, 206335–37, 206338–41, 206342–43, 206344–47, 206348–51	$52A^1$	15	Linnei, Yunlin; Cishan, Kaohsiung; Gaoshu, Pingtung; Ligang, Pingtung; Taitung city; Beinan, Taitung; Luye, Taitung	2006
208201–02, 208203–04, 208205, 208206–07, 208252–53, 208254–55	$11A^1$	6	Zhongpu, Chiayi	2008
209197–200	$4A^1$	1	Linluo, Pingtung	2009
210253–56, 210257–60, 210317–18, 210331–32, 210337–40, 210341–44	$20A^1$	6	Linnei, Yunlin; Yujing, Tainan; Fongshan, Kaohsiung; Liouguei, Kaohsiung	2010
211055–57, 211149–52, 211167	$8A^1$	3	Puli, Nantou; Wufeng, Taichung; Kaohsiung city	2011
Total	$262A^1 : 16A^2$	106		

DNA 序列，結果這 8 個疫病菌的 ITS DNA 序列長度均為 786 bp，且序列完全相同。將該等基因序列 [代表者為 TARI 89148 (A^2) GU111649 與 TARI 201164 (A^1) GU111661] 均上載到 NCBI 網站，利用 BLAST 搜尋軟體與 GenBank 資訊庫收錄的 DNA 序列進行比對，對應到序列完全一致的菌種為 *P. palmivora*，登錄號為 KJ755111.1 等 40 菌株，相同度為 100%。本試驗結果顯示 *P. palmivora* DNA 序列的比對結果支持形態鑑定的可信度。

表 2. 台灣木瓜疫病菌 *Phytophthora palmivora* 的孢囊大小。

Table 2. Size of the sporangia of *Phytophthora palmivora* isolated from papaya in Taiwan.

Isolate no.	Mating type	Sporangium Length (μm)	Sporangium width (μm)	Sporangium L/B	Location	Year
7701	A^2	29-(48.2)-61.5	20-(33.2)-36	1.13-(1.45)-1.74	Chiayi city	1977
8823	A^1	26-(40.5)-60	20-(28.1)-40	1.08-(1.44)-1.96	Zhuqi, Chiayi	1988
89148	A^2	25-(49.2)-54	20-(31.8)-35.5	1.0-(1.55)-2.08	Taibao, Chiayi	1989
96103	A^1	42-(50.2)-60	24-(28.6)-34	1.4-(1.75)-2.15	Erhshui, Changhua	1996
96104	A^1	38-(51.5)-60	26-(33.7)-42	1.18-(1.53)-2.08	Erhshui, Changhua	1996
97040	A^1	30.5-(45)-55.5	21.5-(27.5)-35	1.19-(1.64)-2.08	Mingjian, Nantou	1997
97071	A^1	30-(50.5)-67	24.5-(32.5)-42.5	1.22-(1.57)-2.22	Nantou city	1997
201164	A^1	42.5-(53.9)-65	25-(31.6)-40	1.43-(1.71)-2.0	Nantou city	2001
206273	A^1	45-(50.8)-60	25-(32.0)-40	1.25-(1.60)-2	Cishan, Kaohsiung	2006
206282	A^1	45-(54.7)-65	30-(33.9)-40	1.43-(1.62)-1.86	Gaoshu, Pingtung;	2006
206295	A^1	45-(50.9)-55	35-(31.5)-45	1.38-(1.63)-2.1	Ligang, Pingtung	2006
206309	A^1	45-(53.5)-60	25-(32)-35	1.43-(1.76)-2.0	Linnei, Yunlin	2006
206338	A^1	42.5-(48.7)-55	25-(27.2)-35	1.43-(1.72)-2	Beinan, Taitung	2006
206348	A^1	50-(52.5)-60	30-(30.9)-40	1.43-(1.71)-2	Luye, Taitung	2006

討論

依據 Erwin & Ribeiro (1996) 收集的資料，為害木瓜的疫病菌有兩種，包括 *P. palmivora* 及 *P. nicotianae* (= *P. parasitica*)， 主要為 *P. palmivora*。而在台灣，依據台灣植物病害名彙記載，為害我國木瓜的疫病菌有兩種，亦為 *P. palmivora* 及 *P. parasitica* (synonym *P. nicotianae*) (Hsu *et al*. 2002)。主要因早年的農業要覽 (Anonymous 1958) 中記載木瓜果實疫病由 *P. parasitica* 引起，根腐病由 *Phytophthora* sp. 等菌引起。而 Huang *et al*. (1976) 的研究報告中指出，為害台灣木瓜的疫病菌應為 *P. palmivora*，而非 *P. parasitica*。在作者的試驗中，近年來從木瓜上分離的疫病菌都是 *P. palmivora*，與 Huang *et al*. (1976) 的報告一致。在本試驗中，曾經從幼苗與土壤中分離到兩株 *P. nicotianae*，可能係污染所致，並未計算在內。

無論在國際上 (Erwin & Ribeiro 1996) 或在國內 (Ho *et al*. 1995)，*P. palmivora* 與 *P. nicotianae* 均為分佈甚為廣泛的熱帶疫病菌，兩菌在形態上有些類似，經常發生鑑定錯誤的情形。兩種疫病菌均屬 Waterhouse (1963) 分類系統中之 group II，兩者的孢囊均具有半球形的明顯乳突，均會形成厚膜孢子；兩者的有性世代亦甚類似，藏精器 (antheridia) 均為單生單室底著，且藏卵器 (oogonia)、卵孢子及藏精器的大小亦相近。此外，兩者均屬於高溫菌，*P. palmivora* 最高生長溫度可達 35℃，而 *P. nicotianae* 為 36–37℃，因此兩者之重疊性非常高。但該兩菌亦有相異之處，主要差別則為：(1) 典型 *P. palmivora* 的孢囊具有脫落性，脫落性 100%，脫落的孢囊具有極短的孢囊梗，長度在 5 μm 以下；而典型 *P. nicotianae* 的孢囊甚少脫落或完全不脫落。木瓜疫病菌的孢囊極易脫落，與 *P. palmivora* 較為一致。(2) 典型 *P. palmivora* 的孢囊較狹長，L/B 值大於 1.4；而典型 *P. nicotianae* 的孢囊較寬，L/B 值小於 1.4，一般為 1.2–1.3，兩者亦容易區別。但該特性有時亦有重疊的情形發生，不能單憑該特性來區分該兩種疫病菌。本試驗木瓜疫病菌孢囊的長寬比值 (L/B) 為 1.44–1.76，與 *P. palmivora* 相同。(3) 菌落形態：典型 *P. nicotianae* 培養在 5% CVA 上時，其菌落均具有嵌紋狀花紋 (mosaic pattern)，而 *P. palmivora* 或其他疫病菌則無此種特性。台灣木瓜疫病菌沒

有嵌紋狀的花紋，與 *P. nicotianae* 相去較遠。此外，*P. palmivora* 與 *P. nicotianae* 的 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 長度與序列差異甚大。本試驗供試的木瓜疫病菌的 ITS 序列與 GenBank 資訊庫收錄的 *P. palmivora* DNA 序列完全一致，與 *P. nicotianae* 則差異甚大。由以上形態與數據佐證，目前存在台灣的木瓜疫病菌應為 *P. palmivora* 無誤。

在木瓜疫病菌的配對型方面，雖然分離到的 278 個菌株中只有 16 個菌株為 A^2 配對型，其餘 262 均為 A^1 配對型，而且 A^2 配對型僅存在 5 個果園中，其餘 101 個果園僅出現 A^2 配對型。但如果將木瓜菌株的分離年代區隔成三個不同時段時，包括 1977–1980 (1980 以前)、1988–2000 及 2001–2011 (2000 以後)；則早年 (1980 年以前) 分離的 13 個菌株均為 A^2 配對型；雖然分離點僅有兩個果園，可能無法代表所有果園的分佈情形，但與往後年代相比較，A^2 分離的比率確實相對較高，顯示早年台灣木瓜園內可能的分佈為以 A^2 為優勢。而 8 年以後，木瓜園內出現的 A^2 菌株大幅度減少，在 1988–2000 年分離的 164 個菌株 (分佈於 13 縣市 30 鄉鎮市區 71 處果園) 中僅有 3 菌株為 A^2 配對型，且分佈在 3 個不同的果園；而在 2000 年以後 (2001–2011) 分離的 101 個菌株 (分佈於 9 縣市 17 鄉鎮市區 33 處果園) 全為 A^1 配對型，均無 A^2 配對型存在。顯示 A^1 菌株為目前台灣木瓜園內的絕對優勢種。

誌謝

本文承蒙行政院農業委員會科技計畫 [101 農科-10.2.2-農-C1(1)] 補助試驗經費，及柯文雄教授修改英文，謹此誌謝。

引用文獻

Anonymous. 1958. Papaya Phytophthora fruit rot and root disease. Agric. Rev. 4:247–248. (in Chinese).

Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. Trans. Br. Mycol. Soc. 66:183–185.

Erwin, D. and O. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS press. St. Paul, MN. 562 pp.

Ho, H. H., P. J. Ann, and H. S. Chang. 1995. The Genus *Phytophthora* in Taiwan. Acad. Sin. Mon. Ser. 15. Taipei. 86 pp.

Hsu, S. T., T. C. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathol. Soc. Pub. Taichung. 386 pp. (in Chinese)

Huang, T. H., D. W. Cheng, and L. S. Leu. 1976. Phytophthora fruit and root rot of papaya in Taiwan. Plant Prot. Bull. 18:293–308.

Hwang, S. C., W. H. Ko, and M. Aragaki. 1975. A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. Mycologia 67:1233–1234.

Ko, W. H., H. S. Chang, and H. J. Su. 1978. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. Trans. Br. Mycol. Soc. 71:496–499.

Stamp, D. J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook, and G. S. Hall. 1990. Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*. Mycol. Pap. 162, Comm. Mycol. Ins. Kew Surrey. 28 pp.

Waterhouse, G. M. 1963. Key to the Species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. 92, CMI, Kew Surrey. 22 pp.

Waterhouse, G. M. 1970. The genus *Phytophthora* de Bary: Diagnoses (or Descriptions) and Figures from the Original Papers. Mycol. Pap. 122. CMI, Kew Surrey. 59 pp.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Snirsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 482 pp.

Mating Type Distribution of *Phytophthora palmivora* from Papaya in Taiwan

Pao-Jen Ann[1,*], Jyh-Nong Tsai[2], and Ien-Tien Wang[3]

Abstract

Ann, P. J., J. N. Tsai, and I. T. Wang. 2014. Mating type distribution of *Phytophthora palmivora* from Papaya in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 63(4):267–273.

From 1977 to 2011, a total of 278 *Phytophthora* isolates were obtained from papaya diseased tissues, including fruit, roots, and young seedlings, which were collected from 106 papaya orchards located at 39 sites (districts, townships or cities) of 13 counties/cities. All isolates were identified as *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, of which 262 isolates were A^1 mating type and only 16 isolates were A^2 mating type. Isolates from 101 of 106 orchards were all of the A^1 mating type, while isolates from 2 orchards were all A^2 mating type. Isolates from the other three orchards contained both A^1 and A^2 mating types, but A^1 was dominant. Only one A^2 was found in each of the 3 orchards. All 13 isolates obtained before 1980 were A^2 mating type. Of the 164 isolates obtained during the periods from 1988 to 2000, 161 were A^1 mating type and only 3 were A^2 mating type. The 101 isolates obtained after 2000 (2001–2011) were all A^1 mating type. These results indicate that A^1 mating type of *P. palmivora* is currently the dominant *Phytophthora* pathogen in papaya orchards in Taiwan.

Key words: Papaya, *Phytophthora palmivora*, Mating type.

Received: July 31, 2014; Accepted: August 20, 2014.
* Corresponding author, e-mail: pjann@tari.gov.tw
1 Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 63(4):274–281 (2014)
DOI: 10.6156/JTAR/2014.06304.03

馬拉巴栗苗木疫病之防治藥劑篩選

陳麗鈴[1] 安寶貞[2,*] 蘇俊峯[3] 楊正偉[4] 蔡幸君[5] 蔡志濃[6] 謝廷芳[7]

摘要

陳麗鈴、安寶貞、蘇俊峯、楊正偉、蔡幸君、蔡志濃、謝廷芳。2014。馬拉巴栗苗木疫病之防治藥劑篩選。台灣農業研究 63(4):274–281。

馬拉巴栗苗木是我國重要之外銷觀葉植物，主產區在彰化溪洲一帶。近年來，田間栽培的馬拉巴栗苗木經常發生腐敗情形，造成苗木死亡、嚴重失編及出口貨品腐敗。先前試驗發現疫病菌 [*Phytophthora palmivora* 與 *P. nicotianae* (= *P. parasitica*)] 為引起馬拉巴栗苗木腐敗的重要病原菌之一，它可以感染馬拉巴栗全株，無論在苗期、編辮時或本田期均可發生，愈年幼的苗木發病愈嚴重。為篩選有效防治藥劑，選取 18 種化學藥劑供試，於研究室測試其對疫病菌孢囊發芽與菌絲生長的抑制效果，並將抑菌效果較佳之藥劑進行盆栽苗木病害防治試驗。試驗結果顯示，多種供試藥劑均有良好的病害防治效果，依序為亞磷酸中和水溶液 (1,000 倍稀釋)、4-4 波爾多液、25% 曼普胺 (2,500 倍稀釋)、80% 鋅錳乃浦 (500 倍稀釋)、50% 達滅芬 (3,000 倍稀釋) 及 58% 鋅錳滅達樂 (1,000 倍稀釋)。

關鍵詞：馬拉巴栗、疫病、*Phytophthora palmivora*、藥劑防治。

前言

馬拉巴栗 [Malabar chestnut, *Pachira macrocarpa* (Cham. et Schl.) Schl. et L. H. Bailey] 原產於中南美洲，屬木棉科馬拉巴栗屬，為常綠或半落葉喬木，主要用途在於觀賞 (Shen 2005)。在台灣，馬拉巴栗苗木是栽培最多的觀葉植物，總面積約 480 ha，主要分布於彰化與屏東兩地，以彰化溪州栽培最多。馬拉巴栗苗木的生產流程共分 5 個環節，包括播種、育苗、編辮、定植及採後處理 (Wang 2010)。馬拉巴栗產業以外銷為導向，苗木輸往中國大陸、日本、韓國、歐美各地，已經有多年歷史。外銷總產值每年約新台幣 2 億元。但自 2009 年起，馬拉巴栗外銷貨品在出貨前即發生嚴重根腐情形，篩選過後的苗木在到岸後腐敗率更高，尤其是白露前後 (國曆 9 月上旬) 的貨品，其根部腐敗率高達 60–70% 以上 (Chern *et al*. 2014)。

在台灣，有關馬拉巴栗病害的研究報導甚少，台灣植物病害名彙記載的馬拉巴栗病害包括褐根病 [*Phellinus noxius* (Corner) Cunningham 引起]、根腐病 [*Phytophthora cinnamomi* Rands, *P. palmivora* (Butler) Butler 引起] 及疫病 [*Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Lionian 引起] (Hsu *et al*. 2002)。在初步分離接種試驗中，發現有多種真菌均可造成馬拉巴栗幼苗根腐與死亡，其中又以 *Phytophthora* spp.、*Pythium splendens* Braun 及 *Lasiodiplo-*

投稿日期：2014 年 7 月 26 日；接受日期：2014 年 9 月 1 日。
* 通訊作者：pjann@tari.gov.tw
1 國立屏東科技大學植物醫學系副教授。台灣 屏東縣。
2 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
4 農委會農業試驗所植物病理組前研究助理。台灣 台中市。
5 農委會動植物防疫檢疫局台中分局嘉義工作站技正。台灣 嘉義市。
6 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
7 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼主任。台灣 雲林縣。

dia theobromae (Pat.) Griff. & Maubl. 較為頻繁 (Chen *et al*. 2010; Ann *et al*. 2012, 2013; Chern *et al*. 2014)，尤其以疫病菌 [*P. palmivora* 與 *Phytophthora nicotianae* (= *P. parasitica*)] 對幼苗生育的威脅最大。

目前台灣對馬拉巴栗疫病並無推薦藥劑，因此本研究主要目的為藥劑篩選，於研究室中測試 18 種化學藥劑對疫病菌 *P. palmivora* 孢囊發芽與菌絲生長的影響，再將抑菌效果較佳藥劑於溫室內進行盆栽苗木病害防治試驗，篩選優良者提供田間病害防治使用之參考。

材料與方法

供試菌株與產孢

以疫病菌菌株 *P. palmivora* p211052 供試，該菌株分離自彰化縣溪州鄉馬拉巴栗幼苗根部，為測試菌株中致病性 (virulence) 最強者 (Chern *et al*. 2014)。先將該菌自保存管移出培養在 5% CVA [5% Clarified V-8 juice agar，將 5% (v/v) V-8 vegetable juice (Campbell, New Jersey, USA) 與 0.2% (w/v) $CaCO_3$ 混合後，經 1,500 rpm 低速離心 5 min。取上層液，再加入 2% (w/v) Bacto agar (Difco, Maryland, USA)]，3–5 d 後，切取新鮮菌絲塊移植於 10% VA (10% V-8 vegetable juice agar, 將10% (v/v) V-8 vegetable juice與0.02% $CaCO_3$ 混合後，加入 2% Bacto agar 後滅菌) 平板培養基上。在不照光環境下培養 3–5 d 後，移置於 24℃定溫箱內照光再培養 1–3 d (1,000–2,000 Lux)，使其產生大量孢囊 (sporangia)。進行試驗前，將含有孢囊的培養皿放置於 30℃定溫箱內 1 h，抑制孢囊間接發芽。以噴霧器將無菌水噴布於含有孢囊的培養基上，使孢囊脫落，並經 3 層滅菌紗布過濾。收集孢囊懸浮液，並調節孢囊濃度為 10^3 Sporangia mL^{-1}，供以下孢囊發芽抑制試驗使用。以游走子 (zoospores) 懸浮液為馬拉巴栗苗木接種源，當供試菌株產生大量孢囊後，每皿加入 20 mL 無菌水，於 15℃下靜置 30 min，再放回室溫 30 min，大部分成熟之孢囊均會間接發芽釋放游走子。將游走子懸浮液濃度調節成每 mL 含有約 10^4–10^5 游走子，供接種試驗用。

供試馬拉巴栗苗木培養

供試接種植物包括自行播種萌芽 1–2 個月的馬拉巴栗幼苗，苗木移植於含有培養土 (Tref, 25-07-12, Jiffy Co., Netherlands) 的塑膠盆 (12.5 cm diam., 13 cm hight) 中，每盆 5 株苗。

化學藥劑抑制疫病菌孢囊發芽的效果

選取曾對疫病有防治效果 (大部分列於植物保護手冊中) 的 17 種化學藥劑供試，包括中和亞磷酸水溶液 (neutralized phosphorous acid solution) (以等重之氫氧化鉀中和) (Ann *et al*. 2009)、4-4 式波爾多液 (4-4 Bordeaux mixture)、石灰硫磺合劑 (lime sulphur mixture)、27.12% 三元硫酸銅水懸劑 (tribasic copper sulfate SC，日產化學有限公司)、80% 福賽得水分散性粒劑 (fosetyl-aluminum WG，拜耳作物科學股份有限公司)、58% 鋅錳滅達樂混合可濕性粉劑 (mancozeb + metalaxyl WP，惠光化學股份有限公司)、35% 依得利可濕性粉劑 (etridiazole WP，大勝化學工業股份有限公司)、66.5% 普拔克溶液 (propamocarb hydrochloride SL，惠光化學股份有限公司)、50% 達滅芬可濕性粉劑 (dimethomorph WP，興農股份有限公司)、23% 亞托敏水懸劑 (azoxystrobin SC，台灣先正達股份有限公司)、25% 曼普胺混合水懸劑 (mandipropamid SC，台灣先正達股份有限公司)、17.7% 安美速水懸劑 (amisulbrom SC，台灣日產化工股份有限公司)、9.4% 賽座滅水懸劑 (cyazofamid SC，亞中實業股份有限公司)、80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 (mancozeb WP，世大農化工廠股份有限公司)、70% 甲基鋅乃浦可濕性粉劑 (Propineb WP，台灣拜耳股份有限公司)、18.7% 達滅克敏水分散性粒劑 (pyraclostrobin + dimethomorph WG，台灣巴斯夫股份有限公司)、及 52.5% 凡殺克絕混合水分散性粒劑 (famoxadone + cymoxanil WG，台灣杜邦股份有限公司)。並以 50% 撲克拉錳可濕性粉劑 (prochlorate manganese WP，台灣拜耳股份有限公司) 為對照藥劑。

將各種藥劑分別添加於滅菌後之 5% CVA 培養基中，並分別調整供試化學藥劑濃度 (a.i.) 為 10 mg a.i. L^{-1}、100 mg a.i. L^{-1} 及 1,000 mg a.i. L^{-1} (波爾多液除外)。以微量吸管吸取孢囊懸浮液，滴於含不同濃度供試化學藥劑的 5% CVA 平板培養基中，每皿 10 滴，再以滅菌玻璃棒將孢囊懸浮液抹平，放置於 24℃無光照定溫箱內，經 16 h 後於顯微鏡下鏡檢孢囊發芽情形，並紀錄其發芽率。本試驗每處理 3 皿，以未添加化學藥劑之 5% CVA 平板為對照組，計算孢囊發芽抑制率 (%)。孢囊發芽抑制率 (%) = [(對照組孢囊發芽率 − 化學藥劑處理孢囊發芽率)/對照組孢囊發芽率] × 100。

化學藥劑抑制疫病菌菌絲生長的效果

供試化學藥劑與前述孢囊試驗之藥劑相同。將供試菌株 *P. palmivora* p211052 培養於 5% VA 培養基上，置於 24℃定溫箱照光培養 3–5 d 後，以孔徑 7 mm 打孔器切取菌落先端菌絲，將菌絲塊移置於已配製好含有不同化學藥劑濃度的 5% CVA 平板培養基中央，每處理各 5 皿，並以未添加化學藥劑的 5% CVA 培養基為對照組。處理後第 4、7 d，分別量取菌絲生長長度，並換算成菌絲生長速率 (mmd^{-1})，再與對照組比較，計算菌絲生長抑制率 (%)。菌絲生長抑制率 (%) = [(對照組菌絲生長速率 − 化學藥劑處理組菌絲生長速率)/對照組菌絲生長速率] × 100。

化學藥劑在溫室內防治馬拉巴栗苗木疫病的效果

進行溫室試驗時，選擇研究室抑制孢囊發芽及/或抑制菌絲生長有效之藥劑 6 種供試，包括 4-4 波爾多液、50% 達滅芬可濕性粉劑 (3,000 倍稀釋)、58% 鋅錳滅達樂混合可濕性粉劑 (1,000 倍稀釋)、25% 曼普胺混合水懸劑 (2,500 倍稀釋)、18.7% 達滅克敏水分散性粒劑 (1,000 倍稀釋) 及 80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 (500 倍稀釋)。此外，亦選擇 4 種試驗室藥效稍差但農民經常使用的藥劑或新藥劑加入供試，包括中和亞磷酸水溶液 (1,000 倍稀釋)、17.7% 安美速水懸劑 (4,000 倍稀釋)、9.4% 賽座滅水懸劑 (2,000 倍稀釋) 及 66.5% 普拔克溶液 (1,000 倍稀釋)。將上述 10 種藥劑分別按比例稀釋後，以噴霧器均勻噴灑於馬拉巴栗幼苗上，每處理 3 盆 (每盆 5 株馬拉巴栗幼苗)，每盆藥劑噴灑量為 20 mL。7 d 後每盆馬拉巴栗再做相同處理，除亞磷酸施藥 3 次外，其餘各處理皆施藥 2 次。最後一次施藥 7 d 後接種疫病菌供試菌株 *P. palmivora* p211052。每盆噴霧接種 20 mL 游走孢子懸浮液 (濃度 10^4–10^5 zoospores mL^{-1})。無施藥對照處理組為無噴佈藥劑，但有接種游走子懸浮液者。調查方式：接種 7 d 後調查馬拉巴栗植株上之病斑數，並換算成發病抑制率 (%)。發病抑制率 (%) = [(對照組病斑數 − 化學藥劑處理組病斑數)/對照組病斑數] × 100。

統計分析方法

先進行變方分析 (ANOVA)，再以最小顯著差異性 (Fisher’s least significant difference; LSD) 測驗，分析各處理間在 5% 顯著水準下之差異性。

結果

化學藥劑抑制疫病菌孢囊發芽之效果

疫病菌 *P. palmivora* p211052 菌株的孢囊接種於 5% CVA 16 h 後，已能完全發芽，發芽管長度在 100 μm 以上，但接種在含有農藥的培養皿上，則發芽能力受到不同程度的抑制 (表 1)。其中，以 50% 達滅芬可濕性粉劑與 58% 鋅錳滅達樂可濕性粉劑抑制孢囊發芽的效果最佳，在 10 mg a.i. L^{-1} 時，即可完全抑制；其次為 25% 曼普胺水懸劑、18.7% 達滅克敏水分散性粒劑及 80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑，發芽抑制率在 90% 以上；藥劑濃度在 100 mg a.i. L^{-1} 時，除上述藥劑外，35% 依得利可濕性粉劑、27.12% 三元硫酸銅水懸劑及 70% 甲基鋅乃浦可濕性粉劑亦有相當的抑菌能力，抑制孢囊發芽率在 90% 以上。而 4-4 式波爾多液亦能完全抑制孢囊發芽。亞磷酸中和水溶液與 80% 福賽得水分散粒劑的的抑菌效果中等；而安美速水懸劑、賽座滅水懸劑、亞托敏水懸劑

表 1. 不同化學藥劑與濃度對馬拉巴栗疫病菌 *Phytophthora palmivora* 孢囊發芽抑制之效果。

Table 1. Efficacy of different chemicals and concentration on sporangial germination of *Phytophthora palmivora* isolated from Malabar chestnut[z].

		Germination inhibition (%) at chemical concentration (ppm, a.i.)[x]		
Chemical	Mechanism[y]	1,000	100	10
4-4 Bordeaux mixture	M1	100.0 a[w]		
50% dimethomorph WP	F5	100.0 a	100.0 a	100.0 a
58% mancozeb + metalaxyl WP	M3, A1	100.0 a	100.0 a	100.0 a
25% mandipropamid SC	F5	100.0 a	100.0 a	99.5 a
80% mancozeb WP	M3	100.0 a	100.0 a	97.5 a
18.7% pyraclostrobin + dimethomorph WG	C3, F5	100.0 a	99.2 a	99.4 a
35% etridiazole WP	F3	100.0 a	97.3 a	86.4 a
27.12% tribasic copper sulfate SC	M1	99.4 a	99.5 a	52.4 b
70% propineb WP	M3	100.0 a	100.0 a	14.0 de
52.5% famoxadone + cymoxanil WG	C1, Un01	98.7 a	86.5 ab	31.4 cd
Neutralized phosphorous acid solution	Un02	75.7 b	75.7 b	30.0 cd
50% prochlorate manganese WP	G1	92.5 a	72.2 b	12.9 de
Lime sulphur mixture	M2	45.2 d	18.9 c	14.9 de
80% fosetyl-aluminum WG	Un02	100.0 a	26.4 c	23.1 cde
17.7% amisulbrom SC	C4	100.0 a	34.5 c	31.1 cd
23% azoxystrobin SC	C3	54.5 c	34.9 c	15.5 de
9.4% cyazofamid SC	C4	25.9 f	25.9 c	36.2 c
66.5% propamocarb hydrochloride SL	F4	33.5 e	17.7 c	8.6 d

[z] Sporangial suspension were plated on 5% CVA amended with different concentrations of chemicals and germination was counted 16 hr after incubation at 24℃.

[y] Feng & Hsu (2010).

[x] Germination inhibition (%) = (Sporangial germination without chemical – Sporangial germination with chemical)/Sporangial germination without chemical × 100.

[w] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to LSD test.

及普拔克溶液的抑菌效果不佳，尤其是普拔克與賽座滅的抑制效果均低於 40%，比非防治疫病菌的對照藥劑撲克拉錳的發芽抑制率還低。

化學藥劑抑制疫病菌菌絲生長之效果

在菌絲生長抑制方面，不同藥劑的抑菌效率亦有差異 (表 2)，其中以達滅芬、鋅錳滅達樂、曼普胺、達滅克敏的抑制效果最佳，在濃度 10 mg a.i. L^{-1} 時即可完全抑制疫病菌的菌絲生長；當藥劑濃度提高至 100 mg a.i. L^{-1} 時，依得利與三元硫酸銅亦可以完全抑制疫病菌的菌絲生長，而中和亞磷酸水溶液亦有 95.7% 的抑菌效果；此外，4-4 式波爾多液亦能完全抑制菌絲生長。與孢囊發芽抑制力相同，安美速水懸劑、賽座滅水懸劑、亞托敏水懸劑、及普拔克溶液抑制菌絲生長的效果均甚差，尤其是亞托敏與普拔克的抑制效果低於 30%，比非防治疫病菌的藥劑撲克拉錳的藥效都差。

化學藥劑在溫室內防治馬拉巴栗苗木疫病的效果

研究室的藥劑篩選結果顯示，達滅芬、鋅錳滅達樂、曼普胺、達滅克敏、鋅錳乃浦及波爾多液對疫病菌的孢囊發芽與/或菌絲生長有優異的抑制作用。此外，中和亞磷酸水溶液、賽座滅、安美速及普拔克亦經常用來防治作物疫病，因此測試此 10 種藥劑對馬拉巴栗幼苗疫病的防治效果，結果 10 種藥劑都有防病效果 (表 3)，與對照不施藥處理達到 5% 顯著性差異，防病率在 68–99% 之間。這些藥劑中

表 2. 不同化學藥劑與濃度對馬拉巴栗疫病菌 *Phytophthora palmivora* 菌絲生長抑制之效果。

Table 2. Efficacy of different chemicals and concentration on mycelial growth of *Phytophthora palmivora* from Malabar chestnut[z].

		Mycelial growth inhibition (%) at chemical concentration (mg L^{-1}, a.i.)[x]		
Chemical	Mechanism[y]	1000	100	10
4-4 Bordeaux mixture	M1	100.0 a[w]		
50% dimethomorph WP	F5	100.0 a	100.0 a	100.0 a
58% mancozeb + metalaxyl WP	M3, A1	100.0 a	100.0 a	100.0 a
25% mandipropamid SC	F5	100.0 a	100.0 a	100.0 a
18.7% pyraclostrobin + dimethomorph WG	C3, F5	100.0 a	100.0 a	100.0 a
35% etridiazole WP	F3	100.0 a	100.0 a	42.7 bcd
80% mancozeb WP	M3	100.0 a	85.8 a	29.7 cde
27.12% tribasic copper sulfate SC	M1	100.0 a	100.0 a	11.6 de
Neutralized phosphorous acid solution	Un02	100.0 a	95.7 a	65.2 b
80% fosetyl-aluminum WG	Un02	100.0 a	84.0 a	34.8 cde
70% propineb WP	M3	92.3 a	83.2 a	44.5 bc
52.5% famoxadone + cymoxanil WG	C1, Un01	100.0 a	50.0 b	17.2 cde
17.7% amisulbrom SC	C4	89.7 a	28.4 c	18.1 cde
9.4% cyazofamid SC	C4	74.2 b	33.5 c	14.2 de
Lime sulphur mixture	M2	48.1 c	34.8 c	6.5 e
50% prochlorate manganese WP	G1,	48.1 c	13.6 c	+[v]
66.5% propamocarb hydrochloride SL	F4	26.5 d	28.4 c	12.3 de
23% azoxystrobin SC	C3	26.5 d	20.6 c	12.3 de

[z] A fresh mycelial agar block was plated on 5% CVA amended with different concentrations of chemicals and colonial diameter were measured 4 days after incubation at 24℃.
[y] Feng & Hsu (2010).
[x] Inhibition (%) = (mycelial growth without chemical – mycelial growth with chemical) /mycelial growth without chemical × 100.
[w] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to LSD test.
[v] Mycelial growth faster than that without chemical.

以中和亞磷酸水溶液 (稀釋 1,000 倍) 防治 *P. palmivora* 疫病的效果最佳，與對照處理組比較，每株平均病斑數由 19.6 病斑降至 0.14 病斑。其餘藥劑的防治效果依序為 4-4 式波爾多液 (每株 0.46 病斑)、25% 曼普胺混合水懸劑 (稀釋 2,500 倍) (每株 0.66 病斑)、80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 (稀釋 500 倍) (每株 1.06 病斑)、18.7% 達滅克敏水分散性粒劑 (稀釋 1,000 倍) (每株 2.34 病斑)、80% 鋅錳滅達樂可濕性粉劑 (稀釋 1,000 倍) (每株 3.46 病斑)、9.4% 賽座滅水懸劑 (稀釋 2,000 倍) (每株 3.74 病斑)、50% 達滅芬可濕性粉劑 (稀釋 3,000 倍) (每株 3.80 病斑)、17.7% 安美速水懸劑 (稀釋 4,000 倍) (每株 4.34 病斑) 及 66.5% 普拔克溶液 (稀釋 1,000 倍) (每株 6.20 病斑)。

討論

在台灣，外銷馬拉巴栗苗木的生產過程繁瑣且冗長，病害的發生經常是苗木生產的主要限制因子，經田間與集貨場調查，主要病害包括有苗木疫病 (*Phytophthora* species 引起)、腐霉根腐病 (*Pythium splendens* 引起) 及苗編黑腐病 (*Lasiodiplodia theobromae* 引起) (Chen *et al*. 2010; Ann *et al*. 2012, 2013; Chern *et al*. 2014)。除此之外，經常可以分離到鐮孢菌 *Fusarium solani*，但都是伴隨上述病菌共同檢測到，或是在病勢進展停止後的病斑上分離得到。在正在進展的腐敗組織上則未能單獨檢測到鐮孢菌，推測其非造成植株根腐與編辮苗失編的主要因子之一，但可加重病情 (作者未發

表 3. 不同化學農藥防治 *Phytophthora palmivora* 引起之馬拉巴栗幼苗疫病之效果。

Table 3. Efficacy of different chemicals on control of Phytophthora seedling blight of Malabar chestnut caused by *P. palmivora*.

Chemical	Dilution	Disease severity[z]	Inhibition rate (%)[y]
Neutralized phosphorous acid solution	1,000×	0.14 e[x]	99.29
4-4 Bordeaux mixture		0.46 e	97.65
25% mandipropamid SC	2,500×	0.66 e	96.63
80% mancozeb WP	500×	1.06 de	94.59
18.7% pyraclostrobin + dimethomorph WG	1,000×	2.34 cde	88.06
58% mancozeb + metalaxyl WP	1,000×	3.46 bcd	82.35
9.4% cyazofamid SC	2,000×	3.74 bcd	80.92
50% dimethomorph WP	3,000×	3.80 bcd	80.61
17.7% amisulbrom SC	4,000×	4.34 bc	77.86
66.5% propamocarb hydrochloride SL	1,000×	6.20 b	68.37
Control		19.60 a	

[z] Seedlings were sprayed with the chemicals twice, or three times for neutral phosphorous acid, and inoculated with zoospore suspension of *P. palmivora* 7 d after the last chemical application, disease index and disease severity of each treatment were counted 7 d after inoculation.

[y] Inhibition (%) = (Disease severity of treatment without chemical – Disease severity of treatment with chemical)/Disease severity of treatment without chemical × 100.

[x] Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to least significant difference (LSD) test.

表資料)。

疫病菌可為害馬拉巴栗全株各部位，無論苗期、編辮時及本田期均可發生，但以幼苗期發病最為嚴重，愈年幼的苗木愈感病，尤其是降雨季節，狂風暴雨之後，經常可以造成苗木全園廢耕。經土壤採樣檢測，病害的初次感染源可來自連作田受污染的土壤、或相鄰近的馬拉巴栗田區，環境合適時，病害嚴重至無法控制疫情 (Chern *et al*. 2014)。試驗結果顯示，為害馬拉巴栗的疫病菌有兩種，包括 *P. palmivora* 與 *P. nicotianae* (Chern *et al*. 2014)，這兩種疫病菌在台灣的寄主範圍都十分廣泛 (Ho *et al*. 1995; Hsu *et al*. 2002)，因此，馬拉巴栗疫病的初次感染源也可能來自鄰近區域的其他寄主作物。

本文主要報告抑制馬拉巴栗疫病菌的藥劑篩選結果及防治病害的溫室試驗結果。在病害防治方面，溫室試驗結果顯示，許多藥劑都對苗木疫病均有良好的防治效果，包括中和亞磷酸水溶液 (1,000 倍稀釋)、4-4 式波爾多液、25% 曼普胺混合水懸劑 (2,500 倍稀釋)、80% 鋅錳乃浦可濕性粉劑 (500 倍稀釋)、18.7% 達滅克敏水分散性粒劑 (1,000 倍稀釋) 及 9.4% 賽座滅水懸劑 (2,000 倍稀釋)。這些藥劑中以 4-4 式波爾多液、鋅錳滅達樂、曼普胺、達滅克敏對疫病菌孢囊發芽與菌絲生長均有良好的抑制能力，顯示其對馬拉巴栗疫病的預防與治療效果均佳；而鋅錳乃浦則對孢囊發芽抑制力較佳，但對菌絲生長的抑制力較差，顯示它的預防效果較佳。亞磷酸在實驗室表現的抑菌效果並非最佳，但溫室防病效果最強，可能與它誘導抗病的能力有關 (Ann *et al*. 2009)。此外，安美速、賽座滅、普拔克在研究室表現的抑菌效果並不理想，但在溫室表現的防病效果尚佳，顯示其抑病原因另有其他機制，尚待探討。本藥劑試驗的溫室防病效果原本擬以罹病級數 (disease index) 與罹病度 (disease severity) (或罹病面積) 表示，但因統計分析後大部分的藥劑藥效未達顯著性差異，至該等方法無法將各藥劑的抑病效果有效區分，故改以病斑數為防病效果之調查基準。

綜合兩篇研究報告 [疫病菌引起之馬拉巴栗苗木腐敗 (Chern *et al*. 2014) 與本研究] 的結果，歸納得知生產健康馬拉巴栗苗木的重要關鍵技術為無病菌污染，首要任務為預防疫病菌感染。因此，在選擇育苗地點時，應找尋排

水良好的新植地或是於水稻輪作後之田區播種育苗，切勿選擇連作田或緊鄰馬拉巴栗田區育苗，以降低疫病菌污染。育苗田須做高畦，作好排水設施；由於作物疫病的發生多在潮濕的降雨季節，因此勿在降雨季節播種、拔苗、定植及收穫，該期間發病與傳播機率較高。其次是配合選用適當藥劑來保護苗木，於種子播種萌芽後，施用稀釋1,000倍中和亞磷酸水溶液，以增強苗木的抗病性，其餘可施用稀釋 1,000 倍 58% 鋅錳滅達樂或其他有效之防治藥劑。可以葉面噴灑或澆灌水方式進行施藥，每月 1 次，約 3 次，另於拔苗編辮前再施用系統性殺菌劑 1 次，保護拔苗時造成傷口的感染。此外，編辮苗回植後亦應立即施藥 1 次，1 個月後再施用 1 次，以保護傷口。此種處理同時對馬拉巴栗疫病與 *Pythium* 引起之苗編根腐病均具有良好的防治效果 (作者未發表資料)。若能於雨季來臨前或下雨過後，加強施藥 1 次，則預防病害發生的效果會更加明顯。而編辮場與集貨場需要定期消毒，於編辮完成時，可將苗木浸於稀釋 1,000 倍之 58% 鋅錳滅達樂 (或其他有效藥劑) 中 5–10 min；在集貨場貨品修剪完畢後，亦應噴灑或浸泡上述藥劑，以保護傷口。

誌謝

本文承蒙行政院農業委員會科技計畫 [101 農科-14.2.1-檢-B3(3)，102 農科-14.2.1-檢-B3(3)] 補助試驗經費，謹此誌謝。

引用文獻

Ann, P. J., J. F. Su, C. W. Yang, J. P. Lin, H. C. Tsay, and L. L. Chern. 2013. Seedling disease of Malabar chestnut caused by *Phytophthora* and *Pythium* and chemical control in greenhouse. Plant Pathol. Bull. 22:169–170. (in Chinese)

Ann, P. J., J. F. Su, C. W. Yang, Z. H. Hsu, C. K. Young, H. C. Tsay, and L. L. Chern. 2012. Seedling braiding disease of Malabar chestnut caused by *Lasiodiplodia theobromae* and management of root rot disease of this crop in the fields. Plant Pathol. Bull. 21:150–151. (in Chinese)

Ann, P. J., J. N. Tsai, I. T. Wong, T. F. Hsieh, and C. Y.Lin. 2009. A simple technique, concentration and application schedule for using neutralized phosphorous acid to control Phytophthora diseases. Plant Pathol. Bull. 18:185–195.

Chen, J. W., L. L. Chern, S. P. Her, and L. Y. Chen. 2010. Study on stem rot of *Pachira macrocarpa*. Plant Pathol. Bull. 19:291. (in Chinese)

Chern, L. L., P. J. Ann, J. F. Su, I. T. Wang, C. W. Yang, H. C. Tsay, J. N. Tsai, J. P. Lin, and T. F. Hsieh. 2014. Seedling blight of Malabar chestnut caused by *Phytophthora* species in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 23 (in press) (in Chinese with English abstract)

Feng, H. T. and J. C. Hsu. 2010. Index and Classification of the Mechanism of Action Mode of Pesticides. Agricultural Chemicals and Toxic Substance Research Institute Pub. Taichung. 37 pp. (in Chinese)

Ho, H. H., P. J. Ann, and H. S. Chang. 1995. The Genus *Phytophthora* in Taiwan. Acad. Sin. Mon. Ser. 15. Taipei. 86 pp.

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. C. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taichung, 386 pp. (in Chinese)

Shen, R. S. 2005. Malabar chestnut. p.877–882. *in*: Taiwan Agriculture Encyclopedia: Crop. 2nd ed. Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei. 926 pp. (in Chinese)

Wang, T. S. 2010. Handbook of Postharvest Treatment for Malabar Chestnut. Chinese Pot Flower Development Association Pub. Taipei. 32 pp. (in Chinese)

Screening of Chemicals for Control of Seedling Blight of Malabar Chestnut in Taiwan

Lih-Ling Chern[1], Pao-Jen Ann[2,*], Jiunn-Feng Su[3], Cheng-Wei Yang[4], Hsing-Chun Tsay[5], Jyh-Nong Tsai[6], and Ting-Fang Hsieh[7]

Abstract

Chern, L. L., P. J. Ann, J. F. Su, C. W. Yang, H. C. Tsay, J. N. Tsai, and T. F. Hsieh. 2014. Screening of chemicals for control of seedling blight of Malabar chestnut in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 63(4):274–281.

Malabar chestnut (*Pachira macrocarpa* Schl. et L. H. Bailey) seedlings are important potted ornamental plants for export in Taiwan. The main production area in Taiwan is at Sijhou, Changhua County. In recent years, production of Malabar chestnut has been impacted with diseases that caused root and basal rots of seedlings, leading to the death of seedlings in the field, loss of braids, and rots of plants in storage container during shipping. Our previous studies indicated that *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora nicotianae* (= *P. parasitica*) were two of the major causal organisms that caused the problem. These *Phytophthora* spp. were able to infect entire Malabar chestnut plant at any production stages, including transplants, braiding, or growth in the field. The main objective of this study was to screen chemicals for Phytophthora disease control in Malabar chestnut seedlings. A total of 18 recommended chemicals for Phytophthora diseases of other crops were tested for their effectiveness in vitro in inhibition of sporangial germination and mycelial growth of *P. palmivora* isolated from the host. Those demonstrated high inhibitions were selected for green house tests. Results showed that several tested chemicals were very effective in reducing seedling blight of Malabar chestnut seedlings, including (listed in descending order of effectiveness) neutralized phosphorous acid (1,000× dilution), 4-4 Bordeaux mixture, 25% mandipropamid (2,500× dilution), 80% mancozeb (500× dilution), 50% dimethomorph (3,000× dilution), and 58% mancozeb + metalaxyl (1,000× dilution).

Key words: Phytophthora diseases, Malabar chestnut, *Phytophthora palmivora*, Chemical control.

Received: July 26, 2014; Accepted: September 1, 2014.
[*] Corresponding author, e-mail: pjann@tari.gov.tw
[1] Associate Professor, Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, ROC.
[2] Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute,Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Former Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute,Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Associate Plant Pathologist, Animal and Plant Health Inspection and Quarantine Bureau, Taichung Branch, Chiayi, Taiwan, ROC.
[6] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute,Taichung, Taiwan, ROC.
[7] Research Fellow and Director, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute,Yunlin, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 63(4):282–290 (2014)
DOI: 10.6156/JTAR/2014.06304.04

台灣山藥上分離的蠶豆萎凋病毒 2 兩個株系之比較鑑定

鄧汀欽 [1,*]　林羿廷 [2]　蔡錦慧 [2]　廖吉彥 [3]　高瑞隆 [4]

摘要

鄧汀欽、林羿廷、蔡錦慧、廖吉彥、高瑞隆。2014。台灣山藥上分離的蠶豆萎凋病毒 2 兩個株系之比較鑑定。台灣農業研究 63(4):282–290。

採集畸形嵌紋的「台農 1 號」山藥病株及黃化嵌紋病徵的日本山藥病株，接種奎藜經單斑分離後分別得到病毒分離株 “YA3” 與 “Yam-7”。陰染法電子顯微鏡觀察，均為球形病毒。兩者都可被蠶豆萎凋病毒 2 (*Broad bean wilt virus 2*; BBWV-2) 抗體檢出。接種後潛伏感染山藥品種 (系)，翌年才在山藥新葉出現病徵且可檢測到病原。以豆類病毒屬 (*Fabavirus*) 廣效性引子對 Fab5’R1F/Fab5’R1R 進行反轉錄–聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)，兩者都增幅得到一 390 bp 的 DNA 產物，此段核苷酸序列 YA3 與 Yam-7 相同度為 94.1%，與中國北柴胡 BBWV-2 分離株相同度為 93.1%。再以 BBWV-2 專一性與引子對 BBWVSSP/BBWVKMRM 進行 RT-PCR，YA3 與 Yam-7 各增幅得一 320 bp 的 DNA 產物，此段核苷酸序列 YA3 與 Yam-7 的相同度為 88.1%，與日本的長形山藥 BBWV-2 分離株相同度為 86.3%，但 Yam-7 與此日本分離株相同度為 96.5%。親緣分析圖也顯示 YA3 與 Yam-7 兩株病毒都屬於一種 BBWV-2，而異於其他同屬的病毒種。這是 BBWV-2 在台灣感染山藥的首發報告。

關鍵詞：豆類病毒屬、引子對、反轉錄聚合酶鏈式反應、核苷酸序列、親緣分析。

前言

山藥 (yam) 屬於薯蕷科 (*Dioscoreaceae*) 薯蕷屬 (*Dioscorea*) 多年生蔓性植物，主要採食部位為塊莖 (tubers) 及部份零餘子 (bulbils)，富含澱粉及蛋白質為非洲地區主要糧食作物之一。另含有薯蕷皂素 (diosgenin)，為合成類固醇荷爾蒙 (steroid hormones) 的先驅物，中國自古以來即為上品藥材，今為台灣流行的保健食品。台灣本土產有野生山藥，自早即有零星人工栽培山藥，在 1980 年代大規模集約化栽培後，種植區域達全島南北兩端，國家型農業生物技術計畫中，曾把山藥列為重點發展的項目之一。台灣的山藥主要栽培品種有白肉系之田薯或大薯 (*Dioscorea alata* L.)，皮下紅肉之大紅與二紅等紅薯 [*Dioscoreaalata* var. *purpurea* (Roxb.) M. Pouch.]，「花蓮 3 號」等長形山藥 (*Dioscorea batatas* Decne)，基隆原生山藥 [*Dioscorea japonica Thunb*. var. *pselldojaponica* (Hay.) Yamamoto]，及恆春原生山藥 (*Dioscorea doryophora* Hance) 等 (Liu *et al*. 1995)。山藥也是政策上作為水田轉作作物之一，2003 年全國總種植面積達 993 ha，至 2011 年仍有 490 ha。

少數山藥種類可開花結籽，但經濟栽培是以無性繁殖為主，主要繁殖器官為其地下塊莖或氣生的零餘子。營養繁殖的結果，母株上所有系統性感染的病害都會繼代傳染到子苗，長期下來造成類似品種退化的現象。台灣早年在馴化培育原生種或積極自國外引種的過程中，

投稿日期：2014 年 8 月 7 日；接受日期：2014 年 9 月 10 日。
[*] 通訊作者：tcde@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組前助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組前助理研究員。台灣 台中市。

未曾顧及適當的檢疫措施，近年來在栽培區已陸續發現病毒病的發生 (Deng *et al*. 2004)。其中病毒複合感染 (mixed infection)，多種病毒繼代傳染累積於塊莖上，造成新苗病徵嚴重的現象逐漸出現，本文即是根據調查與鑑定的結果所做的報告之一。

材料與方法

病毒分離及寄主範圍接種試驗

2002 年至 2007 年在台灣各山藥產區採集疑似病毒病徵之罹病株進行接種試驗，具病徵之山藥葉片加入 10 倍量 (W/V) 之 0.1 M、pH 7.1 磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 研磨淬取後接種至紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn)、綠藜 (*C. murale* L.)、奎藜 (*C. quinoa* Willd.)、千日紅 (*Gomphrena globosa* L.)、及圓葉菸 (*Nicotiana benthamiana* L.) 等指示植物，以探討可能發生之病毒種類。其中，可在奎藜上形成局部病斑的樣本，則以單斑分離來獲得純系病毒分離株 (isolates)，並進一步接種番杏 [*Tetragonia tetragonioides* (Pall.) Kuntze]、番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.]、Takii 早生種蠶豆 (*Vicia faba* L.)、芝麻 (*Sesamum indicum* L.) 等進行寄主範圍試驗，並回接山藥 (*Dioscorea* spp.) 各品種 (系)。所有病毒分離株分別繼代接種保存於奎藜，作為以下試驗的病毒來源。

電子顯微鏡觀察

從保存病毒分離株的奎藜上取有病斑的葉片，切取汁液以等量 2% 磷鎢酸 (Phosphotungstic acid; PTA) 進行陰染後，以 Hitach 7000 電子顯微鏡進行觀察。

酶聯抗體免疫分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

所有病毒分離株取部份葉部組織利用購自 DSMZ (Braunschweig, Germany) 的蠶豆萎凋病毒 1 (*Broad bean wilt virus 1*; BBWV-1)、蠶豆萎凋病毒 2 (*Broad bean wilt virus 2*; BBWV-2)、山藥嵌紋病毒 (*Yam mosaic virus*; YMV) 及 potyviruses 廣效性免疫試劑等，依使用說明進行酶聯抗體免疫分析 (ELISA)，另以自製的胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 抗體同時進行間接法 (indirect) ELISA (Clark & Adams 1977)。

反轉錄 – 聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)

供試材料包括各分離株及山藥零餘子、葉、芽及塊莖等。取 100 mg 供試材料，利用全量 RNA 純化試劑組 (Plant Total RNA Extraction Miniprep System; Viogene, CA, USA)，進行 RNA 之萃取純化。再以病毒 RNA 為模版 (template)，利用 Ferrer *et al*. (2007) 所發表豆類病毒屬 (*Fabavirus*) 病毒間廣效性引子對：Fab5’R1F (5’-AAATATTA-AAACAAACAGCTTTCGTT-3’) 及 Fab5’R1R (5’-TTCAAAGCTCGTGCCATNTYATTK-GC-3’, N = A, T, C, or G ; Y = T or C; K = T or G) 及反轉錄 – 聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 試劑 (AccuPower RT/PCR Premix; Bioneer, Daejeon, Korea) 進行 RT-PCR。分別取 1 μL RNA、2 μL 0.5 μM引子 (Fab5’R1F/Fab5’R1R) 及 15 μL DEPC-DW 加入 AccuPower RT/PCR Premix tube 中混合均勻後，將反應液置於 MultiGene TC-9600 Thermo Cycler (Labnet, Edison, NJ, USA) 中進行增幅反應，反應溫度及時間如下：先於 70℃反應 5 min，10℃反應 10 min，42℃反應 60 min，94℃反應 2 min，之後再進行 94℃反應 30 s，反應 55 s，70℃反應 60 s，共 35 個循環，最後一個循環中 70℃下聚合 10 min。反應結果的 DNA 產物以電泳進行分析，預估可增幅出 354–356 bp (BBWV-1) 或 386–391 bp (BBWV-2) 的核酸片段。

另利用 Kondo *et al*. 2005 報告感染山藥的 BBWV-2 專一性引子對：BBWVVSSP (5’-GT-BTCDAGTGCTYTDGAAGG-3’, B = C, G, or T; D = A, G, or T; Y = C or T) 及 BBWVKM-RM (5’-TDGWDCCATCVAGICKCATTTT-3’, W = A or T; V = A, C, or G; I = Inosine; K = G

or T)，進行上述 RT-PCR，預估可增幅得到一 322 bp 的 DNA 產物。

病毒核酸解序與親緣分析

經上述 RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段，以小量膠體 DNA 回收組 (Gel AdvancedExtraction Miniprep System; Viogene, CA, USA) 進行 DNA 回收及純化，再以 yT&A 載體及 ECOS101 勝任細胞 (competent cell) (Yeastern Biotech，台北市，台灣) 進行選殖，取轉型株質體經電泳分析確認嵌入片段之大小，委由明欣生物科技公司 (台北市，台灣) 進行核苷酸序列分析。利用 ClustalX2 (http://www.clustal.org/) 進行 alignment，與 GenBank 資料庫中同屬的病毒種/株相對應之基因序列比較，再以 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (http://www.megasoftware.net/) 之 Neighborhood-joining 作成親緣關係樹狀圖。

結果

病毒分離接種鑑定

所有供試樣本以葉片汁液進行接種試驗，其中一個於 2002 年春採自南投縣名間鄉葉片畸形嵌紋的「台農一號」山藥 (*D. alata*) (圖 1A)，另一個於 2007 年秋採自台南縣將軍鄉葉片黃化嵌紋的日本山藥 (*D. batatas*) (圖 1B)，都可在 *C. quinoa* 形成局部病斑，經單斑分離後獲得病毒純系的分離株，分別命名為 “YA3” 與 “Yam-7”，兩者的寄主範圍試驗結果相同，

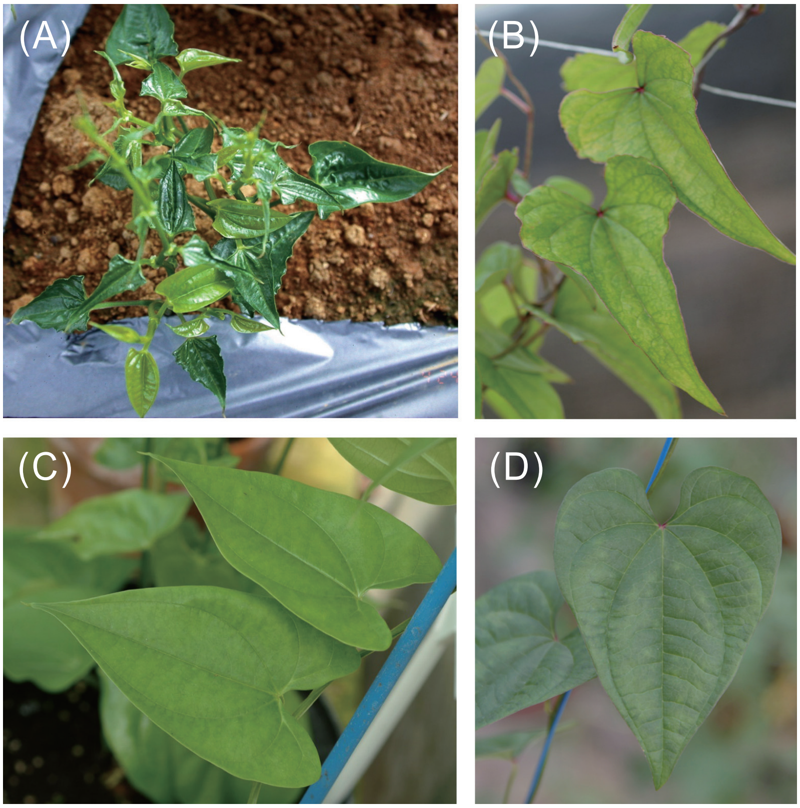

圖 1.　病毒在山藥植株造成的病徵。(A) 葉片畸形嵌紋的「台農一號」山藥；(B) 葉片黃化嵌紋的日本長形山藥；(C) YA3 接種後感染大汕山藥葉片的輕微嵌紋病徵；(D) YA3 接種後感染鐵棍山藥葉片的黃斑病徵。

Fig. 1.　Symptoms shown on yam plants caused by virus infection. (A) Mosaic and malformation on leaves of *Dioscorea alata* cv. ‘Tainong No. 1.’; (B) Yellowing and mosaic symptoms of leaves of *Dioscoreabatatas*; (C) Mild mosaic symptomshowed on leaf of *Dioscorea alata* inoculated with YA3; and (D) Chlorotic spotsshowed on leaf of *Dioscorea opposita* inoculated with YA3.

都僅感染紅藜、綠藜、奎藜及番杏，不感染圓葉菸、番茄、大豆、蠶豆及芝麻。兩者感染山藥各品種 (系) 都不顯示病徵，待翌年發芽後才出現部份病徵，且經 ELISA 檢測結果確定病毒感染。其中 YA3 感染的山藥有：屬於 *D. alata* 的「台農一號」、「台農二號」、「大汕」、「非洲山藥」、「牛腿」、「二莿」、「紅皮削」及「無柄罐型薯」等；屬於 *D. alata* var. *purpurea* 的「二紅」、「玉血薯」及「名間長紅」等；屬於 *D. japonica* var. *pselldojaponica* Thunb. 的「基隆山藥」；屬於 *D. persimilis* Prain & Burkill 的「人蔘味山藥」；與屬於 *D. opposite* Thunb. 的「鐵棍山藥」。接種後感染「大汕山藥」及「鐵棍山藥」的病徵分別如圖 1C 和圖 1D。

病毒形態與抗體反應

以電子顯微鏡觀察病毒純系分離株，YA3 與 Yam-7 都僅發現直徑約 26 nm 的球形病毒顆粒，未發現絲狀病毒顆粒。兩株病毒與 BBWV-1、BBWV-2、CMV、YMV 及 potyviruses 廣效性免疫試劑的反應如表 1，都與 BBWV-2 有較強的血清反應，與 BBWV-1 有較弱的交互反應。

反轉錄–聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

總共 10 個供試材料，利用廣效性引子對 Fab5'R1F/Fab5'R1R 進行 RT-PCR 的結果如圖 2。YA3、Yam-7 及 BBWV-2 sesame 分離株都增幅得到一約 390 bp 的 DNA 產物，對應於 *Fabavirus* RNA1 的 5' 端非轉譯區 (5'-non-translated region,5' NTR) 部份核苷酸序列，或由專一性引子對 BBWVVSSP/BBWVK-MRM 增幅得到一 322 bp 的 DNA 片段對應於 RNA2 的大鞘蛋白與小蛋白 (LCP + SCP) 部份核苷酸序列。

病毒核酸解序與親緣分析

由上述 RT-PCR 增幅所得 RNA1 的部份 5' NTR 之核苷酸序列進行比對，結果如表 2，YA3 與 Yam-7 序列相同度為 94.1%；與 GenBank 資料庫中已登錄豆類病毒屬病毒之相對基因進行比對，YA3 與中國北柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) BBWV-2 分離株 (Acc No. FJ485686) 相同度最高為 93.1%；與 BBWV-1 (Acc No.AB084450) 及龍膽嵌紋病毒 (*Gentian mosaic virus*, GeMV, Acc No.AB084452) 相同度僅分別為 62.2% 及 42.0%。此段基因序列進行 neighborhood-joining bootstrap analysis 的結果，繪成親緣關係樹狀圖則顯示於圖 3。

另由增幅所得 RNA2 的大鞘蛋白與小蛋白 (LCP + SCP) 之核苷酸序列進行比對，結果如表 3，YA3 與 Yam-7 序列相同度為 88.1%，YA3 與 BBWV-2 日本的分離株 (Acc

表 1. 山藥病毒分離株與其他寄主的病毒分離株之酶聯抗體免疫分析反應值比較 [z]。

Table 1. Comparative ELISA values of viruses isolated from yams and those from other hosts[z].

			ELISA value (A405 nm) reacted with antibody to				
Isolate	Virus species	Original host	BBWV-1	BBWV-2	CMV	YMV	POTY
YA3		*Dioscorea alata*	0.220	1.127	0.074	0.184	0.025
Yam 7		*Dioscorea batatas*	0.277	1.412	0.063	0.110	0.013
DS09-3	YMV	*D. alata*	0.037	0.094	0.004	0.420	0.229
CT-1	YMV	*D. alata*	0.083	0.159	0.089	0.659	0.144
Sesame	BBWV-2	Sesame	0.244	1.050	0.066	0.088	0.025
Cucumber	CMV	Cucumber	0.054	0.146	1.228	0.350	0.003
Lima	CMV	Lima bean	0.289	0.164	1.956	0.088	0.007
Safflower	CMV	Safflower	0.468	0.122	2.667	0.092	0.011
+ CK			0.324	1.196	2.340	1.092	1.179
- CK			0.046	0.079	0.045	0.047	0.022

[z] BBWV-1: *Broad bean wilt virus 1*, BBWV-2: *Broad bean wilt virus 2*, CMV: *Cucumber mosaic virus*, YMV: *Yam mosaic virus*, andPOTY: *Potyvirus*.

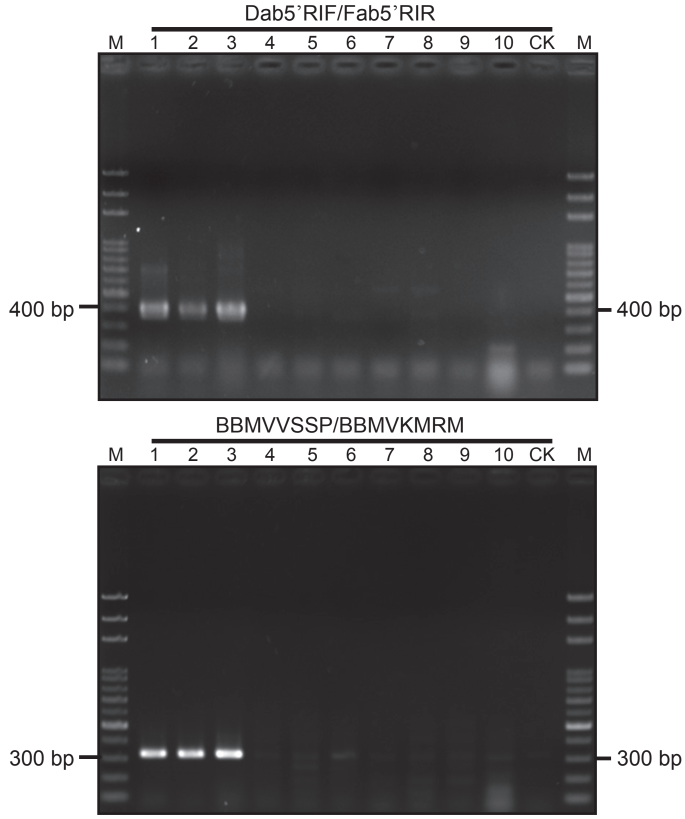

圖 2. 反轉錄–聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 的結果：以 Fab5’R1F/Fab5’R1R 做引子對所得一 390 bp 的 DNA 片段 (上)，及以 BBWVVSSP/BBWVKMRM 做引子對所得一 322 bp 的 DNA 片段 (下)。1：YA3 分離株、2：BBWV-2 sesame 分離株、3：Yam-7 分離株、4：山藥零餘子 B、5：山藥名間長紅 09-1 之葉、6：零餘子 07/11/29-7、7：二紅 07-7-1 之芽、8：二紅 07-7-1 之塊莖、9：名間長紅 05-2 之葉、10：埤頭豇豆之葉及 CK：對照組 (DDW)、M：分子量標示。

Fig. 2. A 390-bp DNA fragment was produced by using Fab5'R1F/Fab5'R1R primers (upper) and a 322-bp DNA fragment by using BBWVVSSP/BBWVKMRM primers (lower) for RT-PCR. 1: YA3 isolate, 2: BBWV-2 sesame isolate, 3: Yam-7 isolate, 4: B bulbil of yam, 5: leaf of yam 09-1, 6: bulbils of 07/11/29-7, 7: shoot of yam 07-7-1, 8: tuber of 07-7-1, 9: leaf of yam 05-2, 10: leaf of cowpea, and CK: control. M: markers for molecular weight.

表 2. 蠶豆萎凋病毒 2 之 YA3 病毒株的 RNA1 部份 5’ NTR 核苷酸序列與其他豆類病毒屬病毒進行比對的相同度。

Table 2. Identitiesof partial polyprotein precursor (5’NTR) nucleotide sequences of RNA1 between YA3 isolate of *Broad bean wilt virus 2* and other *Fabavirus* species.

Virus species or isolates (GenBank Accession No.)	Host	Geographic origin	Identity (%)	Contributor (Literature cited)
Broad bean wilt virus 2				
Yam-7	Yam	Taiwan	94.1	
BC isolate (FJ485686)	*Bupleurum chinense*	China (Beijing)	93.1	Sui *et al*. 2009
XJ14-3 (FN985164)	Tomato	China (XinJiang)	92.3	Du & Huang (unpublished)
Sesame	Sesame	Taiwan	86.4	
Patchouli mild mosaic virus (NC_003975)	Patchouli	Philippines	92.0	Onobori *et al*. (unpublished)
Broad bean wilt virus 1				
AB084450 (ATCC PV132)	Spinach	USA	62.2	Kobayashi *et al*. 2003
Gentian mosaic virus (GeMV) (AB084452)	Gentain	Japan	42.0	Kobayashi *et al*. 2005

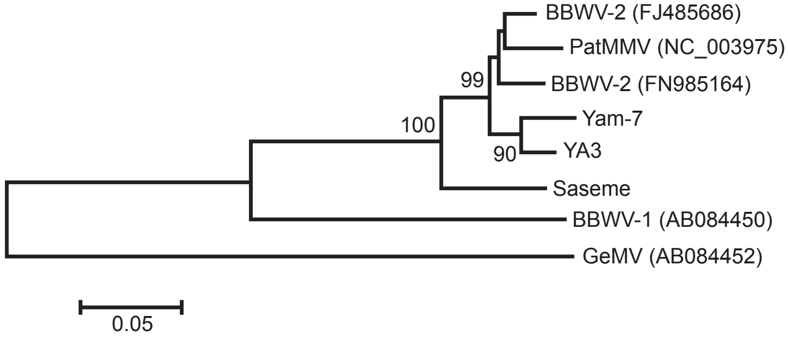

圖 3. 以 RNA1 的 5’ 端非轉譯區部分核苷酸序列經親緣關係分析所作樹狀圖。

Fig. 3. Phylogenetic dendrogram of sequence of partial polyprotein precursor (5’NTR) of RNA1. The tree was generated by neighborhood-joining method (MEGA4). The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1000 replications. FJ485686: BBWV-2, BC isolate; NC_003975: *Patchouli mild mosaic virus*, Philippines isolate; FN985164: BBWV-2, XinJiang Tomato isolate; AB084450: BBWV-1, ATCC PV132 Spinach isolate; AB084452: Gentian mosaic virus, GeMV. (Bar = 0.05 changes per nucleotide)

表 3. 蠶豆萎凋病毒 2 之 YA3 病毒株的 RNA2 部份大鞘蛋白與小蛋白核苷酸序列與其他豆類病毒屬病毒進行比對的相同度。

Table 3. Identities of partial LCP and SCP nucleotide sequences of RNA2 between YA3 isolateof *Broad bean wilt virus 2* and other *Fabavirus* species.

Virus species or isolates (GenBank Accession No.)	Host	Geographic origin	Identity (%)	Contributor (Literature cited)
Broad bean wilt virus 2				
Yam-7	Yam	Taiwan	88.1	
Nagaimo (AB207244)	Yam	Japan	86.3	Kondo *et al*. 2005
Fruit sage (EF392660)	Fruit sage	Taiwan	82.9	Wang & Lin (unpublished)
Patchouli mild mosaic virus (NC_003974)	Patchouli	Philippines	83.5	Ikegami *et al*. (unpublished)
Broad bean wilt virus 1				
AB084451 (ATCC PV132)	Spinach	USA	53.7	Kobayashi *et al*. 1999
Gentian mosaic virus (GeMV) AB084453	Gentain	Japan	53.4	Kobayashi *et al*. 2005

No. B207244) 及台灣的水果鼠尾草 (*Salvia dorisiana* Standl.) 分離株 (Acc No. F392660) 核苷酸序列相同度分別為 86.3% 及 82.9%，但 Yam-7 與 BBWV-2 日本分離株 (Acc No. B207244) 及台灣的水果鼠尾草分離株 (Acc No. F392660) 核苷酸序列相同度分別為 96.5% 及 85.4%。此段基因序列進行 neighborhood-joining bootstrap analysis 的結果，繪成親緣關係樹狀圖則顯示於圖 4。兩段親緣分析結果顯示 YA3 與 Yam-7 兩株病毒與屬於 BBWV-2 的其他病毒株分類地位較接近，而異於同屬的 BBWV-1 及 GeMV。

討論

蠶豆萎凋病毒 2 (BBWV-2) 屬於豆類病毒屬 (*Fabavirus*)，豇豆嵌紋病毒亞科 *(Comovirinae*)，植物小 RNA 病毒科 (*Secoviridae*)，小 RNA 病毒目 (Picornavirales)。Chen *et al*. (2001) 從洋桔梗上分離出蠶豆萎凋病毒-2，這是台灣的首發報告。後有從台灣的水果鼠尾草分離的 BBWV-2 登錄於 GenBank (Acc. No. EF392660)，但迄今未正式發表報告。早期所發現的蠶豆萎凋病毒 (*Broad bean wilt virus*) 是一種病毒，內分 BBWV-1 與 BBWV-2 兩個血清型 (serotypes) (Uyemoto & Provvidenti 1974)。1987 年國際病毒分類委員會 (Inter-

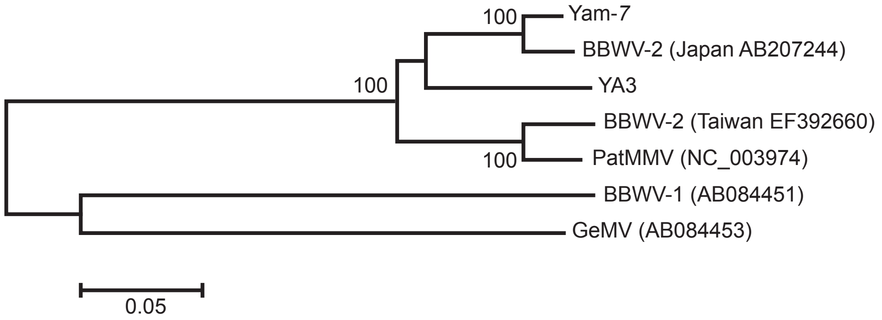

圖 4. 以 RNA2 的大鞘蛋白 (LCP) 與小鞘蛋白 (SCP) 部分核苷酸序列經親緣關係分析所作樹狀圖。

Fig. 4. Phylogenetic dendrogram of partial sequence of LCP and SCP of RNA 2. The tree was generated by neighborhood-joining method (MEGA4). The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1000 replications. AB207244: BBWV-2, Japan Nagaimo isolate; EF392660: BBWV-2, Taiwan fruit sage isolate; NC_003974: *Patchouli mild mosaic virus*, Philippines isolate; AB084451: BBWV-1, ATCC PV132 spinach isolate; AB084453: Gentian mosaic virus, GeMV. (Bar = 0.05 changes per nucleotide)

national Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 將 *Broad bean wilt virus* 1 (BBWV-1) 與 *Broad bean wilt virus* 2 (BBWV-2) 歸為 Fabavirusgroup 下的兩個種 (species)。由於廣藿香微嵌紋病毒 (Patchouli mild mosaic virus; PatMMV) 的 RNA 解序完成 (Ikegami *et al*. 1998, 2001)，從 1998 年加入為 *Fabavirus* 屬下一個新種，但 2005 年後被認為係 BBWV-2 的一株 (Fauquet *et al*. 2005)。而龍膽嵌紋病毒 (*Gentian mosaic virus*) 自 2005 年後即被認定是 *Fabavirus* 屬下的一種 (Kobayashi *et al*. 2005)。依照 ICTV 最新的分類標準，本研究中有關核酸序列比對或親緣分析的結果顯示 YA3 與 Yam-7 親緣相近，且都與屬於 BBWV-2 的其他病毒株 (包括 PatMMV) 分類地位較接近，尤其 Yam-7 與日本的山藥分離株 (Acc No.AB207244) 最接近，而大異於同屬的 BBWV-1 及 GeMV。綜合核酸系列比對、親緣分析、血清學反應、病毒型態及寄主反應等條件顯示，YA3 與 Yam-7 分類都屬 BBWV-2。

國際間山藥種原流通時，為維持種原的健康，聯合國 FAO/IBPGR 在 1989 年所提及的 10 種檢疫病蟲害中有 6 個是病毒，分別是：*Chinese yam necrotic mosaic virus* (CYNMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Dioscorea alata virus* (= Yam virus I), *Dioscorea bacilliform virus*, *Dioscorea latent virus*, *Yam mosaic virus* (YMV) (Brunt *et al*. 1989)。其中，雖無 BBWV-2 列名，但 1985 年在日本即有 BBWV 感染山藥的報告 Ishikawa *et al*. (1985)，本研究繼 Kondo *et al*. (2005) 之後也發現 BBWV-2 感染山藥的現象，而且發現台灣現有山藥品種多數可受其感染，因此在山藥的健康種苗培育過程不應忽視 BBWV-2 的存在。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 100 農科-9.3.1-農-C2 計畫經費支援，謹致謝忱。

引用文獻

Brunt, A. A., G. V. H. Jackson, and E. A. Frison. 1989. FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Yam Germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Board for Plant Genetic Resources. Rome. 20 pp.

Chen, C. C., W. F. Ko, S. L. Taso, and C. H. Chao. 2001. Isolation and identification of a *Fabavirus* from Lisianthus. Bull. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Stn. 70:51–63. (in Chinese with English abstract)

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristic of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. J. Gen. Virol. 34:475–483.

Deng, T. C., J. Y. Liao, C. H. Tsai, and R. L. Kao. 2004. Occurrence and identification of *Japanese yam mosaic virus* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 13:351–352. (in Chinese)

Fauquet, C., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball. 2005. Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press. San Diego. 1162 pp.

Ferrer, R. M., M. Luis-Arteaga, J. Guerri, P. Moreno, and L. Rubio. 2007. Detection and identification of species of the genus *Fabavirus* by RT-PCR with a single pair of primers. J. Virol. Methods 144:156–160.

Ikegami, M., H. Kawashima, T. Natsuaki, and N. Sugimura. 1998. Complete nucleotide sequence of the genome organization of RNA2 of *patchouli mild mosaic virus*, a new favavirus. Arch.Virol. 143:2431–2434.

Ikegami, M., Y. Onobori, N. Sugimura, and T. Natsuaki. 2001. Complete nucleotide sequence and the genome organization of *Patchouli mild mosaic virus* RNA1. Intervirology 44:355–358.

Ishikawa, R., H. Nieta, S. Namba, S. Yamashita, and Y. Doi. 1985. Purification of a small spherical virus and *Yam mosaic virus* in Chinese yam. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 51:99. (in Japanese)

Kobayashi, Y. O., A. Kobayashi, K. Hagiwara, H. Uga, Y, Mikoshiba, T. Naito, Y. Honda, and T. Omura. 2005. *Gentian mosaic virus*: A new species in the genus *Fabavirus*. Phytopathology 95:192–197.

Kobayashi, Y. O., A. Kobayashi, M. Nakano, K. Hagiwara, Y. Honda, and T. Omura. 2003. Analysis of genetic relations between *Broad bean wilt virus* 1 and *Broad bean wilt virus* 2. J. Gen. Plant Pathol. 69:20–326.

Kobayashi, Y. O., M. Nakano, S. Kashiwazaki, T. Naito, Y. Mikoshiba, A. Shiota, M. Kameya-Iwaki, and Y. Honda. 1999. Sequence analysis of RNA-2 of different isolates of broad bean wilt virus confirms the existence of two distinct species. Arch. Virol. 144:1429–1438.

Kondo, T., S. Fuji, K. Yamashita, D. K. Kang, and M. U. Chang. 2005. *Broad bean wilt virus* 2 in yams. J. Gen. Plant Pathol. 71:441–443.

Liu, S. Y., J. Y. Wang, Y. T. Shyu, and L. M. Song. 1995. Studies on yams (*Dioscorea* spp.) in Taiwan. J. Chin. Med. 6:111–126.

Sui, C., J. H. Wei, Q. Q. Zhan, and J. Zhang. 2009. First report of *Broad bean wilt virus 2* infecting *Bupleurum chinense* in China. Plant Dis. 93:844.

Uyemoto, J. K. and R. Provvidenti. 1974. Isolation and identification of twoserotypes of broad bean wilt virus. Phytopathology 64:1547–1548.

Comparative Characterization of Two Isolates of *Broad bean wilt virus* 2 Infecting Yams (*Dioscorea* spp.) in Taiwan

Ting-Chin Deng[1,*], Yi-Ting Lin[2], Chin-Hui Tsai[2], Jye-Yann Liao[3], and Ruei-Lung Kao[4]

Abstract

Deng, T. C., Y. T. Lin, C. H. Tsai, J. Y. Liao, and R. L. Kao. 2014. Comparative characterization of two isolates of *Broad bean wilt virus* 2 infecting yams (*Dioscorea* spp.) in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 63(4):282–290

Leaf samples with mosaic and malformation on *Dioscorea alata* and that with yellowing and mosaic symptoms on *Diosocoreab atatas* were collected for inoculation tests. Both of them developed local lesions on *Chenopodium quinoa*, and two virus isolates 'YA3' and 'Yam-7' were obtained through single lesion isolation. YA3 and Yam-7 both with spherical visions were observed by electron microscope and they reacted with antibody to *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2) were detected by ELISA. When back-inoculated to *Dioscorea* spp., tested plants of some cultigens with latent infections showed symptoms only in the following years and the virus was detected by ELISA. With *Fabavirus* common primers Fab5'R1F/Fab5'R1R, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted to amplify a 390 bp DNA product from both of YA3 and Yam-7. The nucleotide sequence of this fragment sharing 94.1% identities between YA3 and Yam-7. Comparing with other isolates, YA3 shared 93.1% identities with *Bupleurum chinense* isolate of BBWV-2. Moreover, with BBWV-2 specific primers BBWVSSP/BBWVKMRM to conduct RT-PCR, both YA3 and Yam-7 obtained a 320 bp product. The identities between YA3 and Yam-7 of this nucleotide sequence fragment were only 88.1%. Comparing with other isolates, YA3 was 86.3% identical to the Japanese isolate of BBWV-2 infecting yams. However, this Japanese isolate shared 96.5% identities with yam-7. Results of phylogenetic analysis also show that YA3 and Yam-7 are closely related and belonged to a BBWV-2, which is different from other species of fabaviruses. This is the first report of BBWV-2 infecting yams in Taiwan.

Key words: *Fabavirus*, Primer, RT-PCR, Nucleotide sequence, Phylogenetic analysis.

Received: August 7, 2014; Accepted: September 10, 2014.
* Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw
1 Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Former Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Former Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 63(4):291–297 (2014)
DOI: 10.6156/JTAR/2014.06304.05

無線射頻辨識技術在基因轉殖作物生物安全管理之應用

曾清山[1] 陳森車[2] 關政平[1] 杜元凱[1] 陳涵葳[1] 吳明哲[3,*]

摘要

曾清山、陳森車、關政平、杜元凱、陳涵葳、吳明哲。2014。無線射頻辨識技術在基因轉殖作物生物安全管理之應用。台灣農業研究 63(4):291–297。

無線射頻辨識 (Radio Frequency Identification; RFID) 技術是一種將無線傳輸機制應用在標的辨識上的技術，透過微晶片標籤，可將資訊讀取連至後端資料庫，用以識別、追蹤與確認標的狀態。本研究目的是利用 RFID 技術在基因轉殖作物生物安全管理上，於各隔離設施出入口架設 RFID 設備，自動記錄基因轉殖作物進出過程與移動資料，透過網路即時傳送並儲存於後端資料庫。系統管理者可即時監控各項資訊，若有問題發生時，可迅速透過伺服端之安全管理平台追溯並鎖定問題區域與事件發生時間。除及時掌控基因轉殖作物資訊外，並經由共同平台詳實記錄每一基因轉殖作物之轉殖品系、繁殖、遺傳性狀調查及生物安全評估等資料。可協助基因轉殖作物管理作業，減少基因轉殖作物外流之風險。

關鍵詞：無線射頻辨識、基因轉殖作物、生物安全。

前言

基因轉殖作物栽培不論種類、栽培面積及種植國家都逐年增加，然而各界對於基因轉殖作物及其產物在人畜食用安全性、基因污染及其他層面的生態環境安全問題仍存有疑慮，必須在特定的隔離試驗區進行相關的科學評估與研究，使其風險降至最低 (Chandler & Dunwell 2008)。國內生物技術進展迅速，陸續有轉殖不同基因之各種轉殖作物品系已開發成功。有鑑於此，政府於行政院農業委員會農業試驗所設置一處基因轉殖作物隔離試驗設施，包含密閉式溫室、半密閉式溫室、隔離溫室、隔離網室及隔離田，並且獲得農業委員會公告認可。隔離設施自 1997 年啟用以來陸續有水稻、木瓜、馬鈴薯、青花菜、香蕉、鳳梨、蝴蝶蘭、菊花等轉殖不同基因之轉殖品系，進行目標性狀評估與環境生態風險評估技術建立 (Chan *et al*. 2007; Tseng *et al*. 2008, 2012)。

各項隔離設施管理，主要是依據農委會農業試驗所「基因轉殖作物田間試驗作業管理規範」，來辦理基因轉殖作物試驗材料、人員、農機具及車輛出入之管制。然而各項進出資料龐大，單靠人力填寫紙本表格方式無法迅速登載安全管理記錄。況且每一隔離設施管制區均需配置管理人力，增加人事成本支出。無線射頻辨識 (Radio Frequency Identification; RFID) 技術為近年發展應用非常迅速的一種無線通訊技術，主要是由讀寫器 (reader)、天線 (antenna)、電子標籤 (tag) 及應用系統 (application system) 等元件所組成，其操作原理如圖 1。讀寫器的天線發射一定範圍的無線電波，當電子標籤進入範圍內，讀寫器就能讀取電子標籤內所儲存的資訊，再藉由標籤所附帶的唯一序號提供給應用系統來進行分辨、管理及追蹤 (Yu 2007)。由於 RFID 能自動而快速地進行識別，同時具有非接觸式讀取、資料可更新、容量大的儲存資料、可重複使

投稿日期：2014 年 7 月 31 日；接受日期：2014 年 10 月 1 日。
* 通訊作者：wu@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組技工。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

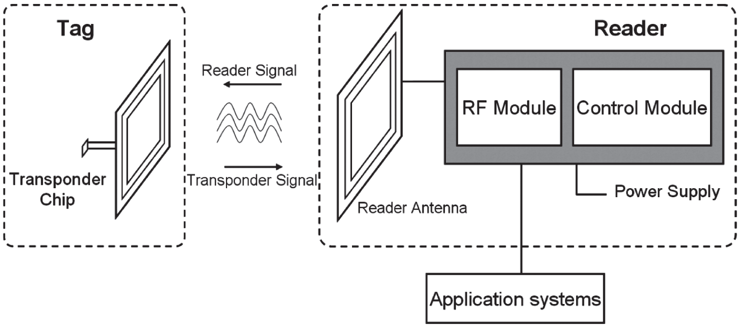

圖 1. 無線射頻辨識系統運作原理圖。

Fig. 1. The components of RFID system (Yu 2007).

用、可同時間讀取多個辨識標籤及資料安全性佳等優點，使得無線射頻系統已經被應用在許多領域上，包括、醫療管理 (Macario *et al*. 2006)、倉儲管理 (Chow *et al*. 2006)、動物監控 (Kampers *et al*. 1999; Wang *et al*. 2006)、圖書管理 (Kern 2004) 與農產品管理 (Amador *et al*. 2009; Costa *et al*. 2013) 等。根據市調機構 IDTechEx (http://www.idtechex.com) 研究顯示，2014 年 RFID 市場將達 88.9 億元美金，2012–2013 年別為 69.6 億元與 77.7 億元美金。

本研究目的將應用無線射頻辨識技術在基因轉殖作物管理，協助各項隔離設施之基因轉殖作物試驗材料、人員、機具及車輛出入之管制、自動記錄進出過程與移動管理等履歷，以提高流程控管精準度，節省人力操作成本，進而提昇管理效率。除此之外，利用 RFID 記錄各項進出資料，可迅速追溯並鎖定問題區域及發生時間等，作為問題釐清與責任歸屬的依據，有效減少基因轉殖作物外流之風險。

材料與方法

建置地點

本研究系統建置地點為農委會農業試驗所之基因轉殖植物田間試驗隔離園區 (TARI, 24°01’N, 120°41’E)，範圍包括密閉溫室、半密閉溫室、隔離溫室與隔離田。

系統評估

RFID 使用無線射頻的方式來進行辨識的工作，大致分成 (1) 低頻 (low frequency; LH)；(2) 高頻 (high frequency; HF) 與 (3) 超高頻 (ultra-high frequency; UHF) 等三部份。每一種無線射頻都有其特性及適合應用的範圍，需考量設置地點的環境因素與管理物品的型態，選擇最適當的 RFID 架構 (表 1)。電子標籤以供電方式可以分成主動式標籤 (active

表 1. RFID 在各頻率之比較表。

Table 1. RFID frequencies comparison.

Item	Low frequency LF	High frequency HF	Ultra-high frequency UHF
Frequency	120–140 kHz	13.56 MHz	868–968 MHz
Multiple reads capability	Usually only single reads	Good	Excellent multiple reads capability
Data transmission rate	Slow data transmission rate	Higher data read rate than LF tags	Fast data transmission rate
Read field	Small Read Field, but easier to define – ideal for reading unique items at close range	Small Read Field, but easier to define – ideal for reading unique items at close range	Read field is much larger than LF or HF, but the radio waves can bounce off objects farther away. Excellent performance in environments with high tag density

tag)、被動式標籤 (passive tag) 與半主動式 (semi-active tag) 等 3 種。

由於 UHF 可一次讀取多個、縮短作業時間，透過非接觸式的感應方式，直接讀取訊息至資料庫內，辨識的速度快、距離長，同時可以讀取多個電子標籤，可減少人為疏失及人力操作，以提高工作效能。而被動式標籤技術成熟度較高、使用壽命可達 10 yr、尺寸較小、讀寫距離 3 m 以下。因此本系統採用 UHF 無線射頻及被動式電子標籤。

系統架構與規劃

基因轉殖作物生物安全管理系統架構示意圖如圖 2 所示，於各隔離設施出入口架設 RFID 設備及影像監控設備。利用 RFID 技術讀取基因轉殖作物試驗材料、人員及農機具之標籤資料，自動記錄進出過程與移動之時間資料，透過網路即時傳送並儲存於後端資料庫。RFID 感應到標籤資料同時啟動影像監控設備，即時記錄影像資料。系統管理者可即時監控各項資訊，若有試驗材料外流發生時，系統管理者可迅速透過伺服端之安全管理平台上追溯並鎖定外流區域與發生時間，以作為未來問題釐清與責任歸屬的依據。各階段作業流程如圖 3 所示，包括隔離試驗區使用申請、人員及基因轉殖作物 RFID 身份化、人員及基因轉殖作物安全管制與記錄、人員及基因轉殖作物資料追溯與查詢。

系統網頁

目前，最常用的 3 種動態網頁語言有 ASP (active server pages)、JSP (Java server pages)、PHP (hypertext preprocessor)。三者都提供在 HTML (hypertext markup language) 標記式語言中混合某種程序程式碼，由語言引擎解釋執行程序程式碼的能力。在 ASP、JSP、PHP 環境下，HTML 標記式語言主要負責描述信息的顯示樣式，而程序程式碼則用來描述處理邏輯。普通的 HTML 頁面只依賴於 Web 伺服器，而 ASP、JSP、PHP 頁面需要附加的語言引擎分析和執行程序程式碼。程序程式碼的執行結果被重新嵌入到 HTML 程式碼中，

圖 2. 本研究基因轉殖作物生物安全管理系統架構示意圖。

Fig. 2. The diagrams showing the framework of the transgenic crop biosafety management system in this study.

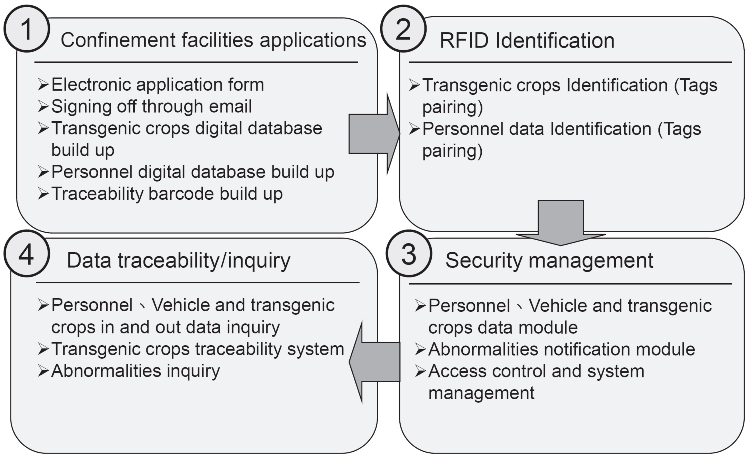

圖 3.　本研究基因轉殖作物生物安全管理系統作業流程示意圖。

Fig. 3.　The diagrams showing the flowchart of the transgenic crop biosafety management system in this study.

然後一起傳送給瀏覽器。ASP、JSP、PHP 三者都是針對 Web 伺服器的技術，客戶端瀏覽器不需要任何附加的軟體支持。本系統開發工具與語言最後選用 PHP 5，係因安裝方便學習過程簡單，資料庫連接方便，相容性強，擴展性強，可以進行面向物件編程。PHP 5 提供了標準的資料庫介面，幾乎可以連接所有的資料庫，本系統資料庫為 SQL server。

結果與討論

系統功能說明

基因轉殖作物生物安全管理系統目前僅開放給相關研究人員申請 (圖 4)，系統介面包括人員管理、影像監控管理、基因轉殖作物管理、各項申請單填寫及試區進出記錄查詢等五大項。人員管理介面提供使用建立會員基本資料，必須填寫姓名、單位、職稱、聯絡電話與住址。經申請核准後才能取得進入各項隔離試驗區的人員標籤卡片，未持有人員標籤卡片之非相關研究人員無法進入，以確保隔離試驗區基因轉殖作物外流之風險。影像監控管理介面提供各隔離設施出入口的即時影像資料及人員進出時的影像資料查詢，目前影像功能僅為監控及記錄用，未來將結合影像識別技術，即時進行人臉數目的計算，並確認接收到的 RFID 標籤數量與人臉數目是否相同，數量相同才會開啟門鎖，不相同則會持續發出語音提示，請人員拿出 RFID 標籤，如此更能提昇人員的安全管理。

基因轉殖作物管理介面提供使用者建立新基因轉殖作物，填寫各項基本資料包含基因轉殖作物物種、轉殖系名稱、親本來源及單位數量等相關資料。利用清單選項可以查詢隔離試驗區所有基因轉殖作物的數量與進出時間，可以有效管理各個隔離試驗設施目前的使用情形。各項申請單填寫介面是將原本為紙本的申請單轉為電子化表單，包含隔離試驗區使用申請單、人員進出申請單、農機具放行單、出入場材料申請單及殘株處理報告單。透過電子化的表單輸入，節省填寫紙本表格的人力操作成本，提高流程控管精準度，進而提昇管理效率。隔離試驗區進出記錄查詢介面提供人員、試驗材料及農機具進出記錄查詢，若有試驗材料外流發生時，可迅速追溯並鎖定外流區域及發生時間等，作為問題釐清與責任歸屬的依據，有效減少基因轉殖作物外流之風險。

系統建置現況與效益評估

導入 RFID 技術，將有利於建立基因轉殖作物資料與追溯歷史資料，除了提供系統管理人員及時掌控基因轉殖作物進出資訊外，經由共同平台及 RFID 技術的應用，詳實記錄每一基因轉殖作物之轉殖品系資料、生產履歷，提

圖 4. 基因轉殖作物生物安全管理系統畫面及功能表。

Fig. 4. The homepage and menu of the transgenic crop biosafety management.

供研究人員建立基因轉殖作物隔離栽培、繁殖、遺傳性狀調查及生物安全評估等資料。其具體效益包含 (1) 節省人事成本由原來 5 人減至 2 人；(2) E 化管理資料完整性相對於紙本管理較容易保存且不易遺失；(3) 基因轉殖作物履歷追溯與資料查詢較簡單；(4) 基因轉殖作物外流風險相對於紙本管理比較低；(5) 相關技術可移轉至國內其他具有隔離設施單位應用如中興大學、中央研究院、亞洲蔬菜中心等。

基因轉殖作物管理系統雖然有效的節省人力成本，但在實際運用時仍遇到一些問題，如訊號干擾源問題：目前 RFID 技術仍無法保證能可一次讀取到所有 RFID 電子標籤的資訊，容易受到環境因子影響，有可能會因障礙物、金屬及水的反射干擾，而造成訊號的衰減降低定位精確度，且其讀取功率會隨使用時間增加而下降，導致其讀取無法達到 100%。另外，RFID 電子標籤雖然具有抗環境的耐性，但也無法保證永久不會損壞或者標籤遺失的可能，這是目前極具挑戰性且必須克服的問題。

結論

隨著國內生物技術進展迅速，已有許多轉殖不同基因之各種基因轉殖作物在農業試驗所基因轉殖植物田間試驗隔離園區進行評估試驗。積極應用資通訊科技來管制敏感試驗材料，協助提昇管理效率，降低基因轉殖作物外流的風險，是必然的策略。同時藉由基因轉殖作物管理系統詳實記錄每一基因轉殖作物之轉殖品系、繁殖、遺傳性狀調查及生物安全評估等資料，提供各研究單位開發基因轉殖作物後續之試驗研究平台。

誌謝

本研究感謝農委會資訊中心 E 化計畫 (100 農科-6.3.1-農-C2、101 農科-7.3.1-農-C21) 的支持，特表謝意。

引用文獻

Amador, C., J. P. Emond, and M. C. do Nascimento Nunes. 2009. Application of RFID technologies in

the temperature mapping of the pineapple supply chain. Sens. Instrum. Food Qual. 3:26–33.

Chan, L. F., W. P. Tseng, M. L. Wei, and H. Y. Lu. 2007. Plant growth and yield evaluation of phytase transgenic potato. J. Taiwan Agric. Res. 56:45–52. (in Chinese with English abstract)

Chandler, S. and J. M. Dunwell. 2008. Gene flow, risk assessment and the environmental release of transgenic plants. Crit. Rev. Plant Sci. 27:25–49.

Chow, H. K. H., K. L. Choy, W. B. Lee, and K. C. Lau. 2006. Design of a RFID case-based resource management system for warehouse operations. Export Sys. Appl. 30:561–576.

Costa, C., F. Antonucci, F. Pallottino, J. Aguzzi, D. Sarriá, and P. Menesatti. 2013. A review on agri-food supply chain traceability by means of RFID technology. Food Bioprocess Technol. 6:353–366.

Kampers, F. W. H., W. Rossing, and W. J. Eradus. 1999. The ISO standard for radiofrequency identification of animals. Comput. Electron. Agric. 26:27–43.

Kern, C. 2004. Radio-frequency-identification in libraries. Elec. Library 22:317–324.

Macario, A., D. Morris, and S. Morris. 2006 Initial clinical evaluation ofa handheld device for detecting retained surgical gauze sponges using radiofrequency identification technology. Arch. Surg. 141:659–662.

Tseng, C. S., M. T. Wu, H. C. Huang, M. H. Lai, and C. G. Chern. 2008. Field assessment of agronomic performance and biosafety of phytase-gene transformed rice. J. Taiwan Agric. Res. 57:175–182. (in Chinese with English abstract)

Tseng, C. S., M. T. Wu, H. C. Huang, and Y. R. Lin. 2012. The green fence of Chinese hibiscus (*Hibiscus rosasinensis* L.) prevents pollen dispersal of transgenic rice (*Oryza sativa*). Plant Prod. Sci. 15:100–108.

Wang, N., N. Zhang, and M. Wang. 2006. Wireless sensors in agriculture and food industry- recent development and future perspective. Comput. Electron. Agric. 50:1–14.

Yu, S. C. 2007. RFID implementation and benefits in libraries. Elec. Library 25:54–64.

Applications of RFID Technology for Transgenic Crops Biosafety Management

Ching-Shan Tseng[1], Sen-Ju Chen[2], Cheng-Ping Kuan[1], Yuan-Kai Tu[1], Hang-Wei Chen[1], and Min-Tze Wu[3,*]

Abstract

Tseng, C. S., S. J. Chen, C. P. Kuan, Y. K. Tu, H. W. Chen, and M. T. Wu. 2014. Applications of RFID technology for transgenic crops biosafety management. J. Taiwan Agric. Res. 63(4):291–297.

Radio Frequency Identification (RFID) is a technology that uses communication via radio waves to exchange data between a reader and an electronic tag attached to an object. The goals of this research were to improve the process control accuracy, save on labor operating costs, and thus enhance the management efficiency. Event triggered sensing and the use of information to log the accessinformation platform to quickly trace and lock problem areas and time of occurrence. The study intends to use the multi-mode wireless automated identification transmission and tracking of transgenic crops in biosafety management, build transgenic crops database to provide data-based information to enhance gene transfer efficiency of transgenic crop management operations.

Key words: Radiofrequency identification, Transgenic crops, Biosafety.

Received: July 31, 2014; Accepted: October 1, 2014.
* Corresponding author, e-mail: wu@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Technician, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow and Director, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 63(4):298–306 (2014)
DOI: 10.6156/JTAR/2014.06304.06

以有機栽培模式選育優質水稻新品系可行性之評估

郭介煒 [1] 郭素真 [2] 許育嘉 [2] 吳永培 [3,*]

摘要

郭介煒、郭素真、許育嘉、吳永培。2014。以有機栽培模式選育優質水稻新品系可行性之評估。台灣農業研究 63(4):298–306。

本試驗利用 130 個嘉農育 911303 號之 EMS 突變系為材料，先於化學慣行法下篩選出各突變系味度值表現優良者，獲選各突變系再進行有機栽培，並依產量及抗稻熱病表現選出 18 個優良突變系進行產量試驗，結果發現突變系 OR3 味度值為 57，稻穀產量較對照品種「台稉 9 號」(‘TK9’) 增產 7%，是稻穀產量潛能佳且食味表現最優良的突變系；而 OR14 稻穀產量較對照品種 ‘TK9’ 增產 16%，味度值 54 與 ‘TK9’ 相同，是產量潛能最佳且品質優良突變系，此二突變系值得開發以供有機栽培利用；而試驗結果顯示可於第一期作透過稻熱病自然發病環境，大幅剔除不抗病及產量潛能不佳突變系，於參試材料數目大幅降低後，再透過產量試驗選育出抗稻熱病、產量潛能佳且品質優越的水稻新品系，而本研究結果可供國內未來建構適合有機栽培之水稻品種選育時參考利用。

關鍵詞：水稻、有機栽培、突變品系、稻熱病。

前言

近年來隨著經濟快速發展，國民所得提高，國人之消費習性改變，對米食之品質要求日益迫切，消費者希望能吃到「既好吃又安全的米」。而台灣地處熱帶及亞熱帶氣候，病蟲害發生頻繁，致使水稻栽培過程往往施用大量農藥，形成消費者對稻米安全之疑慮。且因農民自製作有機堆肥之情形大幅減少，商品化有機肥料又價格昂貴，因此造成水稻生產過程常需仰賴大量化學肥料的施用，終致土壤發生劣變，間接影響了水稻生長及品質表現。而為達到稻作產業的永續經營，並為後代子孫留下美好的生活環境，實行國內栽培面積最大作之有機栽培，對維護台灣優質農業的生產具有關鍵的角色。尤其水稻有機栽培之功效包括直接供應作物生長所需之營養要素成分、改良及維持土壤理化性質 (Su 1987; Fortun *et al*. 1989; Reganold 1989)、保護水資源、優質環境維護、廢棄物減量再利用及提昇產量及品質之效果 (Koshino 1990)，符合維護台灣優質農業生產需求意義，故水稻有機栽培有在農業永續經營有其效果。

所謂有機米之定義是指在規劃完成之優質米適栽區內，種植推薦之優質米品種，在栽培過程中不使用化學肥料、農藥及生長調節劑等，且依照優質米栽培方法及乾燥、碾製技術，其生產之純有機米稱之 (Lee & Chen 1998)。因此水稻有機栽培成敗的主要關鍵在於栽培地點選定、地力培養、品種選擇育苗、整地、肥料、雜草、病蟲害與灌排水管理等適當合理的操作，如此才能有效建構水稻有機栽培的生產模式；這些因子中以品種選擇之影響最大，因適合有機栽培品種需具有抗病、抗蟲及對肥料反應較為遲鈍等特性，且稻穀產量要能達到一定水準，如此便可減低肥料管理、病

投稿日期：2013 年 9 月 18 日；接受日期：2014 年 10 月 13 日。
* 通訊作者：wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] 國立嘉義大學農藝系助理教授。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系研究助理。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

蟲害管理等因子之影響，大幅提升有機能栽培的成功率，使從事有機栽培之農民能降低栽培風險，進而增加栽培意願而有效擴展有機水稻之栽培面積，進而達到經濟模式 (Lee & Chen 1998; Lee 2009)。

目前國內有機作物栽培面積來看，2013 年國內有機栽培面積為 5,937 ha，其中水稻栽培面積為 2,059 ha，占 34.68%，為有機栽培面積最大之作物，其用於有機栽培主要品種包括「台稉 2 號」、「台稉 9 號」、「台南 11 號」、「高雄 139 號」、「高雄 145 號」、「台東 30 號」等等品種，唯因病蟲害問題使得栽培風險高，使得有機水稻種植面積無法有效大幅提高，故若能透過育種方法開發與培育，找到適合有機栽培之水稻新品種，其對擴大有機水稻之栽培面積將有重大助益。至於有關台灣環境下之有機栽培對水稻生長及品質影響情形 (Lee *et al*. 1999a, 1999b, 2002a, 2002b)，Lee *et al*. (2009) 在以連續 19 期作水稻有機栽培田進行田間試驗中，結果指出不同有機質肥料種類及施用量，對水稻生育會有影響，以施用有機肥之水稻產量顯著低於化學肥料處理者，而在生產成本並兼顧產量及稻米品質考量下，每公頃以施用 2,000 kg ha^{-1} 菜籽粕可獲得較高水稻產量及較佳的品質。而在稻米品質方面，有機栽培所生產稻米之直鏈澱粉含量會高於化學肥料栽培者，粗蛋白質含量則接近或低於化學肥料栽培者，凝膠展延性則會相近，但白米食味品質則優於化學肥料栽培者 (Lee *et al*. 2002b)。至於碾米品質中之白米率與完整米率則會因有機肥料量不同而有影響，尤其不同品種因有機肥料種類、施用量及年度不同，其產量及品質的反應有所差異 (Lee *et al*. 2009)。上述結果顯示水稻有機其環境與水稻品種間存在交感效應，找出有機栽培下對有機肥料量較鈍感且生育、抗病蟲佳又高品質的水稻新品種，其栽培上的利基方能有效大幅提高。

檢視國內水稻推廣品種各種抗病蟲性，結果發現目前推廣的水稻品種中，其稻熱病之抵抗性除「台稉 4 號」、「台稉 6 號」及「台稉 10 號」外，均具有不同程度之抵抗性，但稻熱病之生理小種變化相當複雜，各年度之表現亦不相同，且因近年「台南 11 號」種植面積大幅擴增，致使稻熱病大發生的機率大幅提高，因此抗稻熱病在有機水稻的栽培上，宜應多加注意；而在對褐飛蝨、白葉枯病及紋枯病的抗性上，大多數品種並未具優良抗性，而以目前國內水稻種原來看，其中白葉枯病及紋枯病因缺乏抗病種原，故很難透過育種進行移轉改良，除非由國外引進在地有效抗的抗病基因，而褐飛蝨的抗性種原由全國統一病圃檢定的材料中仍可發現存在相當多之抗蟲性種原，未來如何有效且快速將抗褐飛蝨之特性轉移至水稻新品種中，藉以提供有機水稻栽培利用，將成為重要的育種課題。

Wang *et al*. (2002) 以化學誘變劑疊氮化鈉誘變法已產生約有 3,000 個「台農 67 號」突變系，其中包括米粒顏色、米粒外觀、蛋白質含量及組成、脂肪酸、食味、直鏈澱粉、抗病蟲性等多種農藝特性的突變系，而同樣利用化學誘變劑疊氮化鈉和 EMS 對「台農 67 號」、「台稉 8 號」、「台農 72 號」、‘IR64’ 等進行誘變，結果選育出低蛋白含量、心白、香米、黃米、糯性、低直鏈澱粉含量、粉狀質、耐鹽及耐旱等水稻胚乳及耐逆境水稻突變體，顯示利用化學誘變可創造相當大且多的變異，具有發展新特性的潛力 (Wu & Lur 2002; Wu *et al*. 2007; Kuo *et al*. 2013; Wu 2013)，而化學誘變所培育之突變系其僅少數或單一基因造成改變，可維持大部份誘變親本之優良形質，故若能利用優良的水稻推廣品種為材料，培育出抗病蟲佳、品質優越的誘變後代，其應可解決目前國內缺乏適合有機栽培之水稻品種的困境。

本試驗乃嚐試於完成有機的栽培狀況下，利用優良香米突變系及不同世代之雜交後代為材料，在嘉義農業試驗分所全國稻熱病檢定圃所在地之天然稻熱病易發生的環境下，探討完全於有機環境下育種的篩選模式，是否能有效率的找出適合國內有機栽培利用的水稻材料。

材料和方法

試驗材料

本試驗材料係以 Wu & Lur (2002) 發表之

EMS 誘變 CNY911303 後，經譜系法培育 1,100 個誘變系，其再透過味度值選拔出 130 個誘變系 (M11 世代) 供做為本試驗主要材料，而其中誘變親本 CNY911303 係以「台農 67 號」經疊氮化鈉誘變選育之口感優良且稻熱病抗性呈 MS-MR 等級之優良誘變系；而本試驗進行時種植「台梗 9 號」(‘TK9’) 做為對照品種，於 2009 年第二期作以採嘉義地區化學慣行法進行栽培，每品系 3 行植，每行 8 株，行株距 30 cm × 20 cm，成熟時收穫中間行 10 株供味度值調查用材料。根據作味度值及農藝特性表現挑選出優良 79 個誘變系，並於 2010 年第一期嘉義農業試驗分所試驗田以單本植方式進行有機栽培，施用粒型有機能肥料 (田全牌 3 號，含氮量 4%) 400 kg ha^{-1}，分基肥、一次追肥、二次追肥及穗肥等 4 次施用，施用比率分別總有機肥料的 35%、15%、15%、35%，且栽培過程不做任何病蟲害藥劑防治，每突變系種植 100 株，行株距 30 cm × 15 cm，不設重複，稻熱病以自然發生環境篩選，並以目視挑選 18 個農藝特性優良且稻熱病發生輕微之突變系供做產量試驗之材料。

產量試驗

以 18 個 M12 世代突變系於 2010 年第二期作進行初級產量試驗，各突變系代號以 OR 代表之，每突變系種植 100 株，每一突變系 4 行植，每行 25 株，行株距為 30 cm × 15 cm，不設重複。而 2011 年第一期作則進行高級產量試驗，試驗採用逢機區集設計 (RCBD) 設計，每突變系種植 100 株，每突變系 4 行植，每行 25 株，4 重複，行株距為 30 cm × 15 cm，成熟時各品系分別收穫調查稻穀產量表現及品質特性，同時種植 ‘TK9’ 做為對照品種。產量試驗均採有機栽培進行，施用粒型有機能肥料 (田全牌 3 號，含氮量 4%) 400 kg ha^{-1}，分基肥、一次追肥、二次追肥及穗肥等 4 次施用，施用比率分別總有機肥料的 35%、15%、15%、35%，且栽培過程不做任何病蟲害藥劑防治。

品質測定

各項品質測定之材料於收穫後自然乾燥至稻穀含水量 14%，提供食味計 AN800 及味度計測定使用材料。

食味計 (KETT AN-800) **品質分析：**每品系取稻穀 150 g，碾製糙米後，利用碎米分離機篩去碎米，取 70 g 白米置入 AN-800 儀器中測定粗蛋白質含量。

味度計 (TOYO MA30) **品質分析：**每突變系之白米秤取 33 g 依機器測定方法進行食味推估值 (味度值；palatability score of MA-30) 測定，每樣品測定需時 15 min。

綜合評估等級

以有機栽培條件下參試材料之稻熱病發病情形及產量、品質測定等特性綜合評估，將其分極差、差、中等、好，及極好等五個等級。極差：稻熱病反應呈現極感級，且稻穀產量低於對照品種 20% 以下；差：稻熱病反應呈現感級且稻穀產量表現低於對照品種 10% 以下；中等：稻熱病發病情形為中感至中抗級，其稻穀產量與對照品種相近；好：稻熱病顯現出抗性且稻穀產量表現優於對照品種 10% 以下者；極好：稻熱病顯現出抗級以上且稻穀產量表現優於對照品種 10% 以上者。而稻熱病反應程度依國際稻熱病檢定標準判斷之 (International Rice Research Insitute 2002)。

結果

本試驗在 2009 年第二期作利用 130 個 CNY911303 之 EMS 誘變系為材料，在一般化學慣行法的栽培環境下先進行材料品質之評估，結果如圖 1 所示，130 個突變系之味度值分布範圍介於 56–79 之間；其中有 10 個品系味度值表現低於 60，占供試突變系 7.7%，而味度值介於 61–65 之突變系有 22 個，有 67 個突變系之味度值介於 71–75，占供試突變系 51.5%，而味度值介於 76–79 者有 12 個突變系，占供試突變系 9.2%，其中對照品種 ‘TK9’ 之味度值表現為 65，而有 98 個突變系之味度值高於對照品種 ‘TK9’，占供試突變系 75.4%；顯示大部份突變系在化學慣行法栽培下味度值的表現均相當優良。

根據 130 個突變系化學慣行法栽培下之

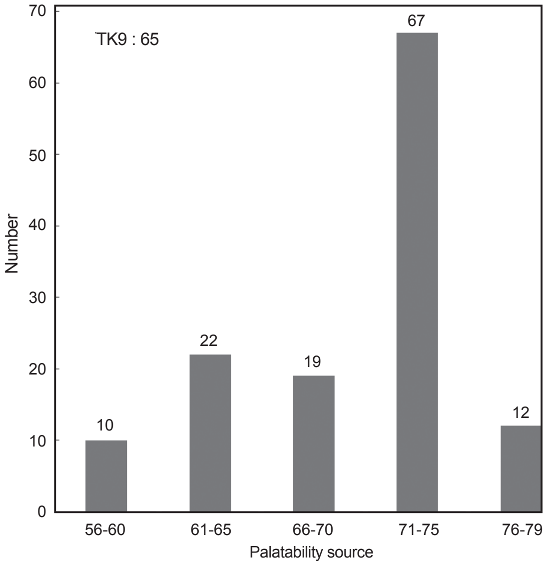

圖 1. 2009 年第二期作化學慣行法栽培下 130 個 EMS 突變系之味度值表現分布。

Fig. 1. The distribution of palatability scores for 130 EMS mutant lines under traditional cultivation in the second crop season of 2009.

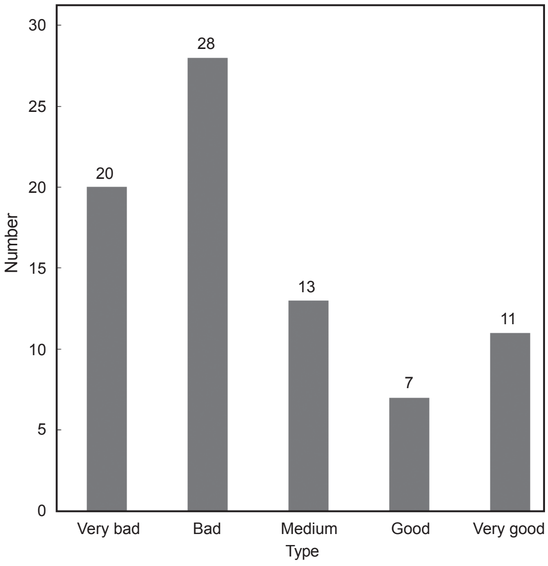

圖 2. 2010 年第一期作 79 個 CNY911303 突變系有機栽培下綜合表現選拔類型之分布。

Fig. 2. The selection types of 79 mutant lines from CNY911303 under organ cultivation in the first crop season of 2010.

味度值表現篩選優良的 79 個突變系為材料，2010 年第一期作在有機環境且不進行任何病蟲害藥劑防治下進行栽培，其經農藝特性及稻熱病發病情形進行材料分群，結果發現有 20 個突變系稻熱病發病十分嚴重 (稻熱病反應呈現極感級) 且稻穀產量低下，是為極差等級，占參試材料 25.3%；而稻熱病發病嚴重 (稻熱病反應呈現感級) 且稻穀產量表現不良者有 28 個突變系，是為差等級，占參試材料 35.4%，而有 13 個突變系稻熱病發病輕微 (中感至中抗級)，其稻穀產量與 ‘TK9’ 相近，是為中等級，占參試材料 16.5%；而對稻熱病顯現出抗性 (抗級以上) 且稻穀產量表現優於 ‘TK9’ 者有 18 個，是為好及極好等級，占參試材料占參試材料 22.8% (圖 2)，故選拔出 18 個優越突變系做為有機栽培產量試驗材料。

根據 79 個突變系農藝特性表現及稻熱病發生之情形選拔出 18 個突變系，18 個突變系在 2010 年第二期作以有機方式進行初級產量試驗，其產量表現之結果如圖 3 所示，在 2010 年第二期作有機栽培下，18 個突變系之稻穀產量表現介於 5,600–8,450 kg ha^{-1}，其

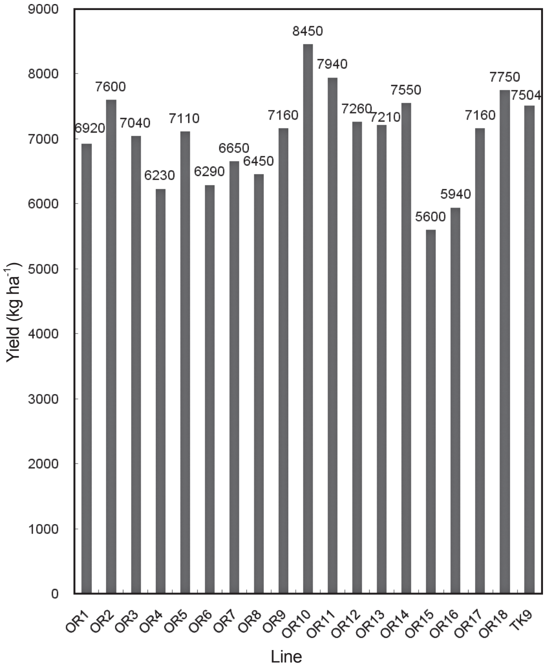

圖 3. 2010 年第二期作有機栽培下 18 個突變系初級產量試驗稻穀產量表現。

Fig. 3. The grain yield of 18 rice mutant lines at preliminary yield trial under organic cultivation in the second crop season of 2010.

中 OR10 之稻穀產量表現最佳，而 OR15 及 OR16 表現較差，而與對照品種 ‘TK9’ 比較，稻穀產量達對照品種 (‘TK9’) 95–99% 之突變系為 OR5、OR9、OR12、OR13、OR17 等 5 個品系；而優於對照品種之突變系則有 OR2、OR10、OR11、OR14 及 OR18 等 5 個，其稻穀產量增產比率為 1–13%。

以各突變系收穫稻穀進行品質分析，結果如圖 4 所示，18 個誘變系味度值介於 41–57，其中以 OR4 味度值 41 表現最差，而 OR3 味度值 57 表現最佳，而 OR2、OR6、OR12 味度值分別為 52、52、51，高於 ‘TK9’ 之味度值 50；而 OR1、OR11、OR14、OR17 等味度值均為 49，與 ‘TK9’ 十分接近。而進一步檢視 18 個誘變系白米粗蛋白質含量的表現，結果發現粗蛋白質介於 5.0–8.2%，其中以 OR2 的粗蛋白質含量 5% 表現最低，而 OR18 的粗蛋白質含量 8.2% 表現最高，而 OR2、OR5、OR7、OR8、OR9、OR13、OR14、OR15、OR16 之粗蛋白質含量分別為 5.1、5.9、5.1、5.3、5.1、5.6、6、5.5、5.4%，低於對照品種 ‘TK9’ 之 6.2%，是粗蛋白質含量表現較低之誘變系；而 OR1、OR3、OR4、OR6、OR10、OR11、OR12、OR17、OR18 等粗蛋白質含量分別為 7.4、8.6、6.6、6.7、7.2、7、7、7.2、8.2%，是粗蛋白質含量表現較高者 (圖 5)。

根據初級產量試驗結果挑選稻穀產量表現高於 7,000 kg ha^{-1} 之突變系進行高級產量試驗，結果挑選出 OR2、OR3、OR6、OR9、OR10、OR11、OR12、OR13、OR14、OR17、OR18 等 11 個誘變系進行高級產量試驗，高級產量試驗結果發現除了 OR12 稻穀產量為 5,865 kg ha^{-1}，低於對照品種 ‘TK9’ 之 6,842 kg ha^{-1}，其餘 10 個突變系之稻穀產量表現均顯著高於 ‘TK9’ 之產量；其中以 OR14 之稻穀產量表現最佳，可達 7,918 kg ha^{-1}，而 OR1、OR6、OR13、OR17 之稻穀產量潛能亦達 7,500 kg ha^{-1} 以上，顯示亦有不錯的高產潛能 (圖 6) 。

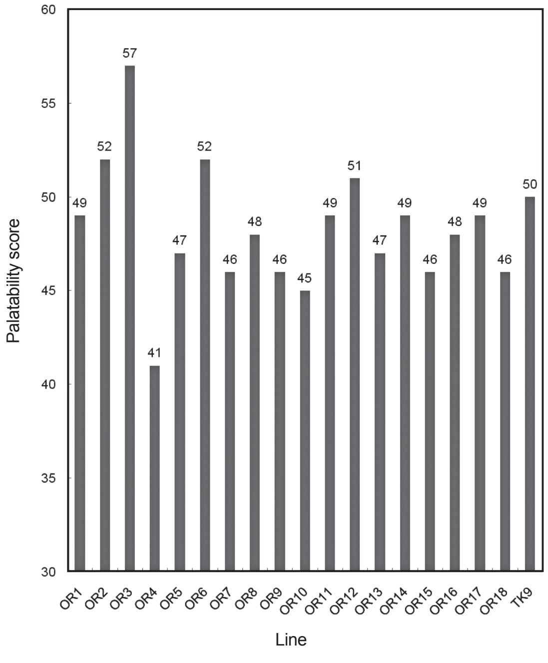

圖 4.　18 個突變系 2010 年第二期作有機栽培下味度值表現。

Fig. 4.　The palatability scores of 18 mutant lines under organic cultivation in the second crop season of 2010.

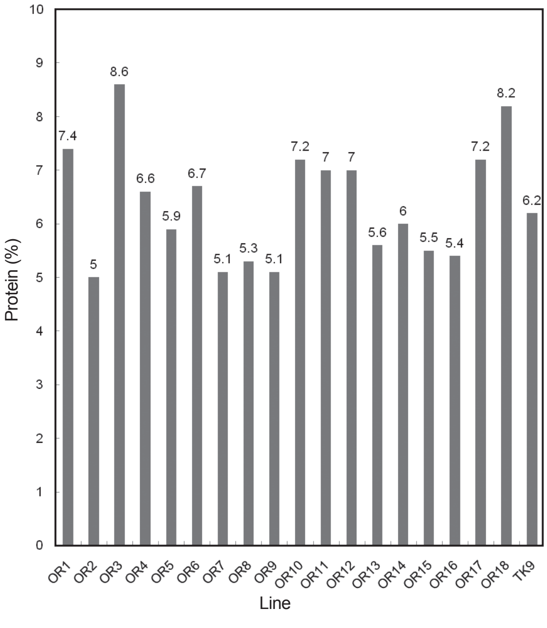

圖 5.　18 個突變系 2010 年第二期作有機栽培下白米蛋白質含量表現。

Fig. 5.　The protein content of 18 mutant lines under organic cultivation in the second crop season of 2010.

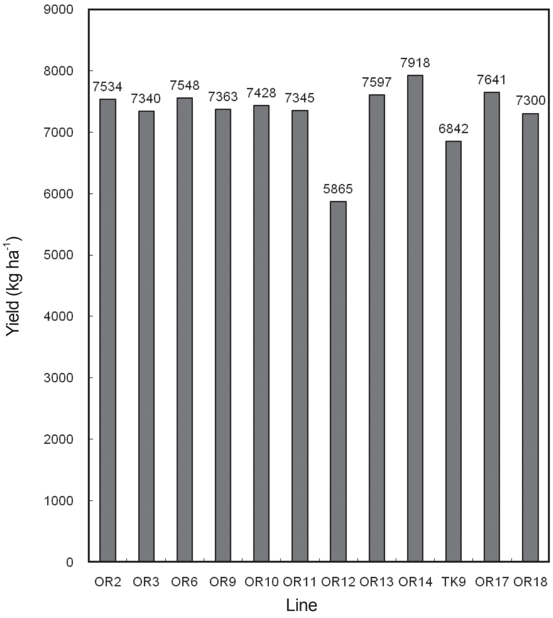

圖 6. 2011 年第一期作 11 個誘變系有機栽培下稻穀產量表現。

Fig. 6. The grain yield of 11 mutation lines under organic cultivation in the first crop season of 2011.

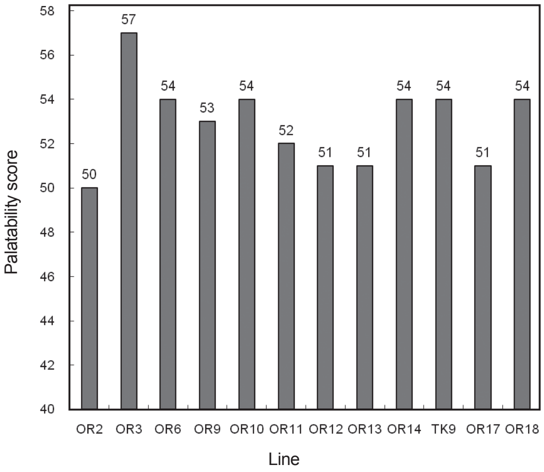

圖 7. 2011 年第一期作有機栽培下 11 個水稻突變系味度值表現。

Fig. 7. The palatability scores of 11 rice mutation lines under organic cultivation in the first crop season of 2011.

進一步檢視高級產量試驗 11 個突變系之味度值表現 (圖 7)，結果發現突變系的味度值分布介於 50–57，而對照品種 ‘TK9’ 味度值為 54，其中以 OR3 味度值 57，是 11 個突變系中表現最佳者，而 OR2 味度值僅 50，是味度值表現最差的突變系；而 OR6、OR10、OR14、OR18 與對照品種 ‘TK9’ 相同，味度值表現均為 54。

討論

130 個突變系在化學慣行法栽培下，其中有 79 個突變系 (75.4%) 味度值的表現優於對照品種 ‘TK9’，顯示這些突變系具有品質優良的潛力，故利用這些優良突變系為材料，在 2010 年第一期作有機栽培下，找出對稻熱病具抗性或耐性且產量表現不錯之突變系，結果確實在稻熱病易發生地區 (行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所) 及無農藥防治下，有 48 個突變系之葉稻熱病發生十分嚴重，而有 13 個突變系雖稻熱病發生中等，但產量表現僅屬中等，而有 18 個突變系稻熱病發生輕微或呈現中抗級以上表現，顯示透過田間有機栽培模式，在嘉義分所稻熱病天然發病環境下，能有效大幅剔除不抗病或產量潛能表現不佳的材料，其後再利用選獲材料透過產量試驗及多重複的試驗設計，精確評估獲選材料的產量潛能及實用性，故可有效且快速找出抗病及產量表現優良的材料，此種育種篩選模式未來應可供國內適用有機栽培專用水稻品種的選育或抗稻熱病育種時之參考利用。

透過初級產量試驗結果可知 OR2、OR5、OR9、OR10、OR11、OR12、OR13、OR14、OR17 及 OR18 等 10 個突變系之稻穀產量可達對照品種 95% 以上，是較產量潛能較佳的突變系，其中以 OR10、OR11 等 2 個突變系之稻穀產量較照品種分別增產 13% 及 6%，是 18 個突變系中產量潛能最佳者，進一步檢視這些突變系味度值的表現，結果發現以 OR1、OR2、OR6、OR11、OR12、OR14、OR17 等味度值優於或接近 ‘TK9’。其中 OR2、OR12、OR11、OR14、OR17 等 5 個突變系之產量潛能及味度值均表現較優良，是較具潛力的突變系；而具有最高產潛能之 OR10，其味度值僅 45 而已，顯示產量潛能雖優良，然食味表現並不佳。

根據初級產量試驗結果先挑選產量表現在 7,000 kg ha^{-1} 之突變系進行高級產量試驗，其結果發現大部份突變系之稻穀產量表現均不錯，顯示初級產量試驗確實已將高產潛能之突變系篩選出來，而根據初級產量試驗結果，以 OR2、OR12、OR11、OR14、OR17 等 5 個突變系之產量潛能及味度值均表現優良，而高級產量試驗中則以 OR3、OR6、OR9、OR10、OR14、OR18 等 6 個突變系之稻穀產量及味度值表現較為優良，而其中以突變系 OR3 味度值 57，優於 ‘TK9’，且稻穀產量亦較 ‘TK9’ 增產 7%，是稻穀產量潛能佳且食味最優良的突變系；而 OR14 之稻穀產量較對照品種 ‘TK9’ 增產 16%，且味度值表現 (54) 與 ‘TK9’ 相同，故此突變系是具有最佳高產潛能及優良品質，是最值得進一步開發與利用之突變系；至於 OR6、OR10、OR18 等 3 個突變系味度值與 ‘TK9’ 相同，而稻穀產量潛能亦較 ‘TK9’ 高 7% 以上，亦具有一定的實用性。再者，就有機栽培稻米粗蛋白質含量來看，其中 9 個突變系之粗蛋白質含量低於 6%，而 OR2、OR7、OR8 及 OR9 等 4 突變系之粗蛋白質含量接近 5% 左右，與國內主要栽培稻在化學慣行栽培下之蛋白質含量表現相比較，Hong *et al*. (1999) 指出國內稉稻栽培品種在化學慣行栽培下之蛋白質含量第一期作介於 5.69–8.27%；第二期作則介於 6.88–8.89%，結果顯示本試驗之突變系在有機栽培下表現出低蛋白質含量的潛力，未來這些品系應可利用有機栽培方式生產低蛋白質米產品，供國內腎臟或氮素代謝有障礙之消費者利用。

本試驗利用化學慣行法下選拔之 79 個品質優良突變系 (味度值 71–79)，這些突變系在有機栽培環境下，可能因病蟲害發生及肥料種類的影響，各突變系的味度值表現明顯較化學慣行法者差，此與 Lee *et al*. (1999a) 報告相類似，其指出使用菜籽粕做為有機質肥料，第二期作準有機及純有機栽培之糙米率及完整米率均顯著低於化學栽培者，不利於水稻之碾米品質；而第一期作準有機及純有機栽培之糙米率及完整米率，則與化學栽培者相同。又第二期作準有機栽培之白米粗蛋白質含量會高於化學栽培者，且凝膠展延性亦較劣於化學栽培者，將不利於烹調及食味品質，而第一期作準有機栽培之白米粗蛋白質含量則會高於化學栽培者，顯示有機栽培會因有機質肥料逐步分解釋放出氮素，而水稻在穀粒充實期因氮素的持續供應，使得米粒蛋白質含量有增加的趨勢，也讓食味口感的表現較差，故本試驗各突變系化學慣行法栽培下的味度值表現優良，但在有機栽培環境下味度值則均大幅下降是可理解的現象。Gami *et al*. (2001) 在進行連續 20 年之稻麥輪作試驗中，結果發現化學肥料混合有機肥料所得到的平均水稻產量較單獨使用化學肥料或有機肥料表現還好。然 Banik *et al*. (2006) 在連續 6 年的試驗中，水稻與稻桿農藝效率均以化學肥料較高，顯示水稻施予有機農法之初期，其生育期及產量結果表現均不如慣行農法，在本試驗結果雖顯示可透過有機栽培產量試驗進行篩選獲得高產潛能之材料，但需考量肥料型式及試驗田有機栽培時間長短。

由於國內水稻尚無有機栽培環境下直接進行育種選拔資料可資參考利用，而本試驗在有機栽培模式下進行水稻育種選拔，其結果顯示可於第一期作透過稻熱病自然發病環境，大幅剔除了不抗病及產量潛能不佳的突變系，使得參試材料數目得以大幅降低，如此便可透過產量試驗，以較大之小區面積及重複數目，針對材料產量潛能及味度值進行較精確的評估，從而選育出抗稻熱病佳且品質優越的新品系，供國內水稻有機栽培利用。尤其國內有機水稻栽培面積近 2,000 ha，大多數有機水稻栽培均利用現有之推廣品種進行，又因國內水稻栽培環境十分複雜多變，造成稻熱病生理小種變化相當大，Liao & Chen (2011) 指出國內主要栽培水稻品種除「台中秈 10 號」外，主要栽培品種之稻熱病抗性均已呈現中感級至高感級，諸如「台南 11 號」(高感)、「台稉 2 號」(感)、「台稉 4 號」(高感)、「台稉 8 號」(感)、「台稉 9 號」(高感)、「台稉 14 號」(中感)、「台稉 16 號」(高感)、「高雄 139 號」(感)、「台中 192 號」(中感)，顯示國內大面積栽培水稻品種之稻熱病抗性已崩壞，而以這些推廣品種進行有機栽培時，由於無法以化學藥劑進行稻熱病的防治，促使有

機栽培的風險大幅提高，故唯有透過育種方法開發並培育抗稻熱病種原，找出適合有機栽培之水稻新品種，如此方對擴大有機水稻之栽培面積有重大助益；然而水稻有機栽培之成本相對較高，為降低有機栽培下之水稻選拔效率，先利用化學慣行法進行水稻早世代之選拔與純化，於水稻品系逐漸趨於固定時，在第一期作利用有機栽培淘汰稻熱病抗性不良及產量潛能表現不佳者的方式，其後便可針對產量及品質進行分析及評估

引用文獻

Banik, P., P. K. Ghosal, T. K. Sasmal, S. Bhattacharya, B. K. Sarkar, and D. K. Bagchi. 2006. Effect of organic and inorganic nutrients for soil quality conservation and yield of rainfed low land rice in sub-tropical plateau region. J. Agron. Crop Sci. 192:331–343.

Fortun, A., C. Fortun, and C. Ortega. 1989. Effect of farmyard manure and its humic fractions on the aggregate stability of a sandy loam soil. J. Soil Sci. 40:293–298.

Gami, S. K., J. K. Ladha, H. Pathak, M. P. Shah, E. Pasuquin, S. P. Pandey, P. R. Hobbs, D. Joshy, and R. Mishra. 2001. Long-term changes in yield and soil fertility in a twenty-year rice-wheat experiment in Nepal. Biol. Fertil. Soils 34:73–78.

Hong, M. C., J. L. Yang, C. S. Sheu, and W. T. Liu. 1999. Variation in crude protein content of rice grain. Res. Fellow Taichung DARES 65:1–11. (in Chinese with English abstract)

International Rice Research Insitute. 2002. Standard Evaluation System for Rice. Philippines. 56 pp.

Koshino, M. 1990. The use of organic and chemical fertilizer in Japan. p.1–16. *in*: Extension Bulletin. No. 312. Food & Fertilizer Technology Center. Taipei, Taiwan, ROC.

Kuo, S. C., C. W. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2013. Marker-assisted selection of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). J. Taiwan Agric. Res. 62:137–156. (in Chinese with English abstract)

Lee, J. F. 2009. Organic cultivation of rice pest management techniques. p.121–129. *in*: Proceedings of Symposium on Achievements and Perspectives of Rice. Protection in Taiwan. (Ni, H. F. and H. R. Yang, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 138. Taichung. 161 pp. (in Chinese with English abstract)

Lee, J. F. and Y. W. Chen. 1998. The technique of rice organic cultivation. p.59–66. *in*: The Technique of Rice Organic Cultivation. (Chen, Y. W., ed.) Taichung District Agricultural Technology Special Issue 159. Taichung. 66 pp. (in Chinese with English abstract)

Lee, J. F., Y. W. Chen, and S. S. Chen. 1999a. Effects of organic culture on the grain-quality of rice. Taichung DARES 63:31–47. (in Chinese with English abstract)

Lee, J. F., Y. W. Chen, and S. S. Chen. 1999b. Effects of organic farming on the growth of rice. Taichung DARES 65:23–38. (in Chinese with English abstract)

Lee, J. F., Y. W. Chen, and Y. F. Tsai. 2009. Effects of organic fertilizers on organic rice quality. Res. Fellow Taichung DARES 103:17–29. (in Chinese with English abstract)

Lee, J. F., Y. W. Chen, S. S. Chen, and Y. F. Tsai. 2002a. Effects of application amounts of various organic fertilizers on rice. Res. Fellow Taichung DARES 74:53–63. (in Chinese with English abstract)

Lee, J. F., Y. W. Chen, S. S. Chen, and Y. F. Tsai. 2002b. Effects of application amounts of various organic fertilizers on rice quality. Res. Fellow Taichung DARES 74:65–77. (in Chinese with English abstract)

Liao, D. J. and L. C. Chen. 2011. Field evaluation of rice varieties and lines from Taiwan for resistance to leaf and panicle blasts caused by *Magnaporthe grisea* during 2003–2008. J. Taiwan Agric. Res. 60:279–292. (in Chinese with English abstract)

Reganold, J. P. 1989. Comparison of soil properties as influenced by organic and conventional farming systems. Am. J. Alternative Agric. 3:144–155.

Su, K. C. 1987. Evolution of rice-based cropping pattern in Taiwan. p.37– 47. *in*: Paddy Field Conversion and Upland Crop Production. (Hsieh, S. C. and D. J. Liu, eds.) Special Pub. No.7 of Taichung DAIS. Taichung. 215 pp. (in Chinese with English abstract)

Wang, C. S., T. H. Tseng, and C. Y. Lin. 2002. Rice biotech research at the Taiwan Agriculture Research Institute. APBN 6:950–956.

Wu, Y. P. 2013. Drought tolerant rice lines by screening an IR64 mutant stock. J. Taiwan Agric. Res 62:195–208. (in Chinese with English abstract)

Wu, Y. P. and H. S. Lur. 2002. Rice mutation breeding. Chinese J. Agron. 12:219–239. (in Chinese with English abstract)

Wu, Y. P., P. Y. Kou, T. H. Tseng, and C. S. Wang. 2007. Screening for the scent and grain quality in rice mutants. J. Taiwan Agric. Res 56:121–133. (in Chinese with English abstract)

Assessment of the Feasibility in Selecting High-Quality Rice Lines under Organic Cultivation System

Chieh-Wei Kuo[1], Su-Chen Kuo[2], Yu-Chia Hsu[2], and Yong-Pei Wu[3,*]

Abstract

Kuo, C. W., S. C. Kuo, Y. C. Hsu, and Y. P. Wu. 2014. Assessment of the feasibility in selecting high-quality rice lines under organic cultivation system. J. Taiwan Agric. Res. 63(4):298–306.

A total of 130 mutants derived from CNY911303, induced by ethyl methanesulfonate (EMS), were screened for good palatability under the cultivation of traditional chemical practice. Those mutants possessing good palatability were then selected for high yield and blast resistance under organic farming. Eighteen mutants were chosen from the pool. After the evaluation of yield production, two mutants, OR3 and OR4, were selected because of their good palatability and high yield. When compared with 'Taikeng 9' ('TK9'), which palatability score was 54 and yield standard was 100%, the palatability scores of OR3 and OR14 were graded as 57 and 54 and yield increased by 7% and 16%, respectively. These two mutants are considered having the potential to be developed for organic farming. Results showed that stress susceptible and poor yield mutants were dramatically eliminated by placing the mutants in the environment of naturally occurred blast in the first cropping season. When trial mutants were reduced to an extent, yield experiment was applied to select new rice varieties that possess blast resistance, high yielding potential, and high grain quality at the same time. As a result, this study provides valuable information in rice breeding suitable for organic farming.

Key words: Rice, Organic cultivation, Mutant line, Rice blast disease.

Received: September 18, 2013; Accepted: October 13, 2014.

[*] Corresponding author, e-mail: wuypei@dns.caes.gov.tw

[1] Assistant Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Research Assistants, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[3] Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 63(4):307–319 (2014)
DOI: 10.6156/JTAR/2014.06304.07

新型綠螢光基因 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 在水稻之表現、評估與應用

王怡雯[1] 賴慧真[2] 謝曉鶯[2] 王強生[3,*] 林大鈞[4,*]

摘要

王怡雯、賴慧真、謝曉鶯、王強生、林大鈞。2014。新型綠螢光基因 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 在水稻之表現、評估與應用。台灣農業研究 63(4):307–319。

高效率、無害的基因表現篩選系統為所有作物基因轉殖必須克服的問題，爰此本研究建構新型 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 報導基因表現系統，並於水稻進行基因功能評估。首先完成 pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP 表現載體之構築，利用農桿菌媒介轉形法，將螢光基因導入水稻基因組。結果發現，兩轉殖系經感染癒傷組織，培養 14 d 後，即可觀察到綠色螢光。而 T1 種子於無菌播種 14 d 後，*35S*::*AcGFP* 轉殖系可在幼苗的胚盤及根部等組織觀察到綠色螢光；*35S*::*ZsGFP* 轉殖系也可在幼苗的胚盤及胚乳表面糊粉層等組織觀察到綠色螢光。然而，兩轉殖系幼苗的芽鞘及幼葉可能因葉綠素的干擾，無法觀察到綠色螢光。此外，*35S*::*AcGFP* 轉殖系各組織的螢光表現皆高於 *35S*::*ZsGFP* 轉殖系，可能肇因於 *35S*::*ZsGFP* 系統的表現效率低所致。以 *AcGFP* 分析玉米 *Ubi-1* 及水稻 *GluB5* 與 *GluC* 啟動子活性，結果發現 *Ubi-1*::*AcGFP* 轉殖系在感染癒傷組織及發芽芽體，均可觀察到螢光表現；而 *GluB5*::*AcGFP* 及 *GluC*::*AcGFP* 轉殖系亦可在感染癒傷組織及發芽芽體觀察到螢光。這些結果顯示，玉米 *Ubi-1*、水稻 *GluB5* 與 *GluC* 啟動子皆可在水稻細胞中驅動 *AcGFP* 表現，生產具有功能的螢光蛋白質。本研究所建構的這些綠螢光基因表現載體系統，應可作為植物基因轉殖的早期篩選標誌，應用於協助較具挑戰性之植物轉殖平台的建立，亦可作為其它重要基因與啟動子的功能分析。

關鍵詞：綠螢光基因、報導基因、啟動子、表現系統、農桿菌媒介轉形、水稻。

前言

水母綠螢光蛋白質 (jellyfish green fluorescent protein; GFP) 因在藍色波長範圍 (470–490 nm) 光線的激發下，會發出綠色螢光而得名。其在植物轉殖或是基因功能評估等試驗，已成為一種非常有效的標示工具並被廣泛應用 (Bolhassani *et al*. 2011)。尤其，綠螢光蛋白質具有對細胞不易產生毒害及物理性破壞，且無需添加反應基質即可直接於活細胞中觀察等優點 (Errampalli *et al*. 1999)，因此，已逐漸取代 β- 葡糖苷酸酶 (β-glucuronidase; *GUS*) 或螢光素酶 (luciferase) 基因，被廣泛應用在各種植物相關的研究 (Stewart 2001)。

Niedz *et al*. (1995) 成功地在甜橙 (*Citrus sinensis* L.) 原生質體中表現野生型 *Aequorea GFP* 基因。同時，該基因也成功於玉米原生質體被表現，然而卻無法在阿拉伯芥 (*Arabidopsis*) 及菸草的細胞中被表達 (Hu & Cheng 1995)。在當時，學者認為強效的啟動子與激

投稿日期：103 年 8 月 4 日；接受日期：103 年 10 月 14 日。
* 通訊作者：wangchansen@nchu.edu.tw 及 dagin@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
3 國立中興大學農藝系副教授兼系主任。台灣 台中市。
4 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

發光源強度及來源，是綠螢光基因表現系統在植物系統應用的重要關鍵因子 (Hu & Cheng 1995; Sheen *et al*. 1995)。

綠螢光基因雖然已於植物細胞中被成功地表現，然而卻一直無法在轉殖植株中，穩定的表現。Haseloff *et al*. (1997) 發現，此乃肇因於綠螢光基因 mRNA 含有一段隱匿的內含子 (cryptic intron)，所以在阿拉伯芥表現時，會因截切 (splicing) 機制的誤認，而移除一段編碼區域，導致轉譯不具功能的綠螢光白質。因此，利用同義突變 (silent mutation) 方式，改變隱匿的內含子截切位點，以解決異常截切問題，即可在轉殖阿拉伯芥中，觀察到改良之 mGFP4 蛋白質的表現，雖然所觀察到的訊號仍較微弱 (Haseloff *et al*. 1997)。陸續有學者以基因工程的技術，改良綠螢光基因，使其激發出不同顏色螢光或是提高螢光激發效率，以符合各種試驗目的之需求 (Heim *et al*. 1994; Heim *et al*. 1995; Heim & Tsien 1996)。其中，以 Yang *et al*. (1996) 利用 F64L、S65T 及 Y145F 三個點突變導入，所發展出強效的綠螢光基因-*EGFP*，最負盛名。目前此基因已是商業化的產品，已被廣泛應用於各種分子生物學和細胞生物學領域相關試驗。除了前述蛋白質工程改良外，學者仍持續自其它水生生物選殖新型的螢光基因，如 *AcGFP*、*AsRED*、*AmCyan*、*ZsYellow*、*ZsGreen* 及 *DsRed* (Matz *et al*. 1999; Lukyanov *et al*. 2000; Labas *et al*. 2002; Matz *et al*. 2002; Gurskaya *et al*. 2003; Chudakov *et al*. 2004; Verkhusha & Lukyanov 2004)。在諸多螢光基因中，*DsRed* 是第一個在植物中表現及應用的 (Jach *et al*. 2001)，而 *AsRed*、*AmCyan*、*ZsYellow*、*ZsGreen* 及 DsRed 等基因，則分別在單、雙子葉植物各種組織中，陸續被表現及觀察 (Wenck *et al*. 2003)。

AcGFP 基因分離自碗水母 (*Aequorea coerulescens*)，可表現出穩定的綠螢光蛋白質 (Gurskaya *et al*. 2003)。其胺基酸序列與前述 EGFP 的序列，具有高度的相似性 (94%)。因此，其光譜性質與螢光強度，皆與EGFP類似，且其在單體 (monomer) 狀態下，即可穩定發出綠螢光，不像 GFP、AvGFP 及 EGFP 等螢光蛋白質，在一般發光環境下常形成雙聚體 (dimer) (Jain *et al*. 2001)，因而更適合應用於蛋白質融合技術 (protein fusion technology)。另一方面，自兔海葵 (*Zoanthus* sp.) 選殖的 *ZsGFP* 基因，可表現較 EGFP 高 2.5 倍強度的綠色螢光 (Matz *et al*. 1999)。然而，目前這兩個強效的螢光基因，仍缺乏詳盡的植物表現資料，而無法應用。

在 1983 年，學者首度利用農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 及合適載體，將微生物基因送入菸草基因體中，並順利表現其性狀 (Fraley *et al*. 1983)，在基因工程研究與應用的領域上，建立一重要的里程碑。水稻是全球近一半人口的主要糧食亦是穀類作物中，基因體最小 (約 420–460 Mb)，且其基因體序列已在 2005 年完成 (IRGSP 2005)。因此，水稻不僅是單子葉植物的模式系統，其基因體功能性研究與轉殖平台，對於植物重要性狀基因的探索與功能分析，扮演著非常重要的角色。

本研究擬針對 *AcGFP* 與 *ZsGFP* 兩強效螢光基因，構築以 *35S* 啟動子驅動之表現系統，繼而轉殖至「台農 67 號」(‘TNG67’) 水稻，觀察這些基因在水稻遺傳背景下的螢光表現情形。最後，利用 *AcGFP* 螢光基因探討玉米 *Ubi-1* 及新選殖胚乳專一表現的啟動子 *GluB5* 與 *GluC* 的活性。所得研究結果，除可協助其它較具挑戰性之植物的轉殖平台的建立，亦可作為相關基因功能與啟動子分析的依據。

材料與方法

試驗材料

本研究以「台農67號」作為基因轉殖材料。自田間採取水稻乳熟期的未熟胚 (18 DAP)，誘導癒傷組織，作為基因轉殖材料。試驗所用載體 pUC35SIN (Wu *et al*. 2009) 與 pCAMBIA1300，及 *A. tumefaciens* EHA105 為中興大學分子生物學研究所陳良築教授所提供。*AcGFP* 與 *ZsGFP* 綠螢光基因分別來自 pAcGFP1 與 pZsGreen (Clontech Co., USA)。而玉米 *Ubi-1* 啟動子片段則來自 pEpyon-42H，

為中興大學生物科技學研究所楊長賢教授所提供。

水稻基因組 DNA 之製備

取 0.1 g 水稻葉片，利用 Tissue Lyser (QIAGEN)，以每秒 1/30 轉震盪 30 s 2 次，進行組織破碎。加入適量的萃取緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS, 10 mM β-mercptoerhanol) 與 200 µg RNase，緩和混合均勻後，於 65℃水浴槽靜置 15 min。接著以 18,516× *g* 離心 10 min，並在加入 5 M 醋酸鉀後，靜置冰上沉澱蛋白質。然後，離心去除沉澱物後，再加入適量 3 M、pH 5.2 的醋酸鈉緩衝液及異丙醇，進行 DNA 沉澱。最後，沉澱的 DNA 再經 70% 酒精洗鹽、乾燥等步驟，回溶於 TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 及 1 mM EDTA, pH 8.0) 並以分光光度計及電泳分析所得 DNA 樣品的品質及濃度，即保存於 -20℃冰箱待用。

「台農 67 號」之胚乳專一性啓動子選殖與綠螢光基因表現系統之構築

胚乳專一性啟動子的選殖部分，依據已發表之水稻 *GluB5* 與 *GluC* 啟動子序列 (Mitsukawa *et al*. 1998; Kusaba *et al*. 2003)，分別設計 GluB5-F、GluB5-R、GluC-F 及 GluC-R 引子 (表 1)。以「台農 67 號」基因組 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95℃ 2 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、55℃ 30s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，增殖出 *GluB5* 與 *GluC* 啟動子片段，再以 T-A 選殖方法，次選殖於 pGEM-T Easy vector (PROMEGA)。經定序確認為帶有正確啟動子插入片段之重組質體後，分別命名為 pGEMGluB5 及 pGEMGluC。

綠螢光表現系統構築的部分，依據已發表之 *AcGFP* 與 *ZsGFP* 基因序列 (Matz *et al*. 1999; Gurskaya *et al*. 2003)，設計 GFP-F 與 GFP-R 引子 (表 1)。再分別以 pAcGFP1 與 pZsGreen 質體 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95℃ 2 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，增殖出 *AcGFP* 與 *ZsGFP* 綠螢光基因片段，再分別以 *Mlu*I 及 *Sac*I 限制酶切位，次選殖於 pUC35SIN。經定序確認為帶有正確啟動子插入片段之重組質體後，分別命名為 pUC35SAcGFP 及 pUC35SZsGFP。接著，設計 35STGNT-IF-F1 及 35STGNT-IF-R1 引子 (表 1)，再分別以 pUC35SAcGFP 與 pUC35SZsGFP 質體 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95 ℃ 2 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，增殖出 *35S* 啟動子 ::*AcGFP*::*NOS* 終止子與 *35S* 啟動子 ::*ZsGFP*::*NOS* 終止子等基因片段，再以 In-Fu-

表 1. 本研究所用的引子及序列。

Table 1. The primers and their sequences used in this work.

Primers	Sequence (5'–3')	Annealing temperature (℃)
GFP-F	GACTACGCGTATGACCATGATTACGCCAAGCT	55
GFP-R	GACTGAGCTCGACTAGTAGGCCTATTATTTTGT	55
HGTII-F	ATACACTACATGGCGTGATTTCATA	65
HGTII-R	ACTATCGGCGAGTACTTCTACACAG	65
35STGNT-IF-F1	GGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGT	55
35STGNT-IF-R1	CCATGATTACGAATTCCCGATCTAGTAACATAG	55
Ubi1-F	TGATTACGCCAAGCTTGTGCAGCGTGACCCG	60
Ubi1-R	AACTGCAGCGTCTAGCCCGGGATCCTGCAGAAGTA	60
GluB5-F	CGGCCAGTGCCAAGCTTGAGAAAAGAAGATTTGCTGAC	55
GluB5-R	ACCATGGTGGCGACCGGTACCGGCTATTTATTGAAAGGATAATG	55
GluC-F	CGGCCAGTGCCAAGCTTGTTCAAGATTTATTTTTGGTATTTA	55
GluC-R	ACCATGGTGGCGACCGGTACCAGTTATTCACTTAGTTTCCCACT	55

sion® HD Cloning Kit (Clontech Co., USA)，分別次選殖於 pCAMBIA1300 的 *Eco*RI 及 *Xba*I 限制酶切位。轉形後菌落經 PCR 檢測及電泳分析、定序確認帶有正確啟動子插入片段之重組質體，即分別命名為 pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP (圖 1A、B)。啟動子活性分析表現系統之構築，設計 Ubi1-F、Ubi1-R、GluB5-F、GluB5-R、GluC-F 及 GluC-R 引子 (表 1)。分別以 pEpyon-42H、pGEMGluB5 及 pGEMGluC 質體 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95℃ 2 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，增殖出 *Ubi-1*、*GluB5* 與 *GluC* 啟動子片段，再別以 *HindIII* 及 *kpnI* 限制酶切位，分別置換 pCAMBIA-35SAcGFP 的 *35S* 啟動子片段。經定序確認為帶有正確啟動子插入片段之重組質體後，即分別命名為 pCAMBIAUbi1AcGFP、pCAMBIA-GluB5AcGFP 及 pCAMBIAGluCAcGFP (圖 2)。

上述經定序確認後之轉殖載體，均以電穿孔法 (Hood *et al*. 1993) 轉形至 *A. tumefaciens* EHA105，供後續水稻基因轉殖用。

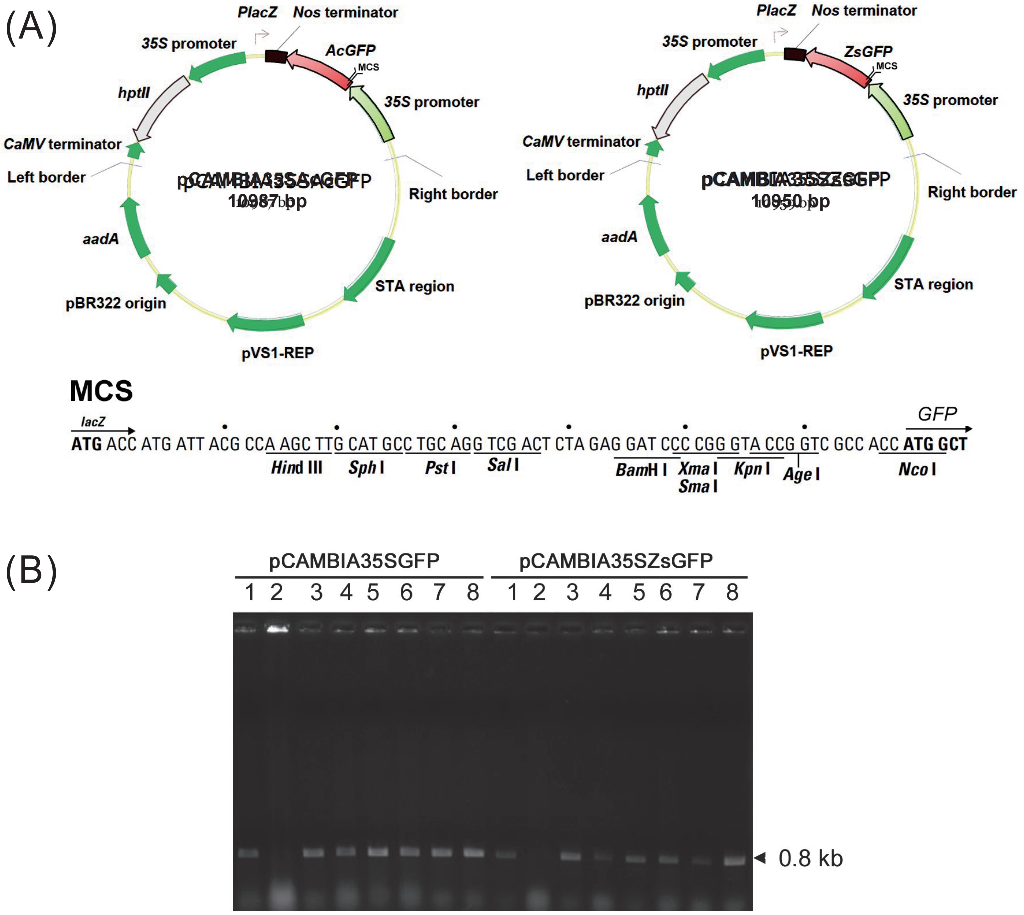

圖 1. 綠螢光基因表現載體系統之建構。(A) pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP 之構築；(B) 利用 colony PCR 確認 GFP 基因存在 pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP 農桿菌轉形株中。

Fig. 1. The development of expression systems of the green fluorescent protein genes. (A) The constructs of pCAMBIA35SAcGFP and pCAMBIA35SZsGFP; (B) Colony PCR analysis of the *Agrobacterium* transformants harbored with pCAMBIA35SAcGFP and pCAMBIA35SZsGFP, respectively.

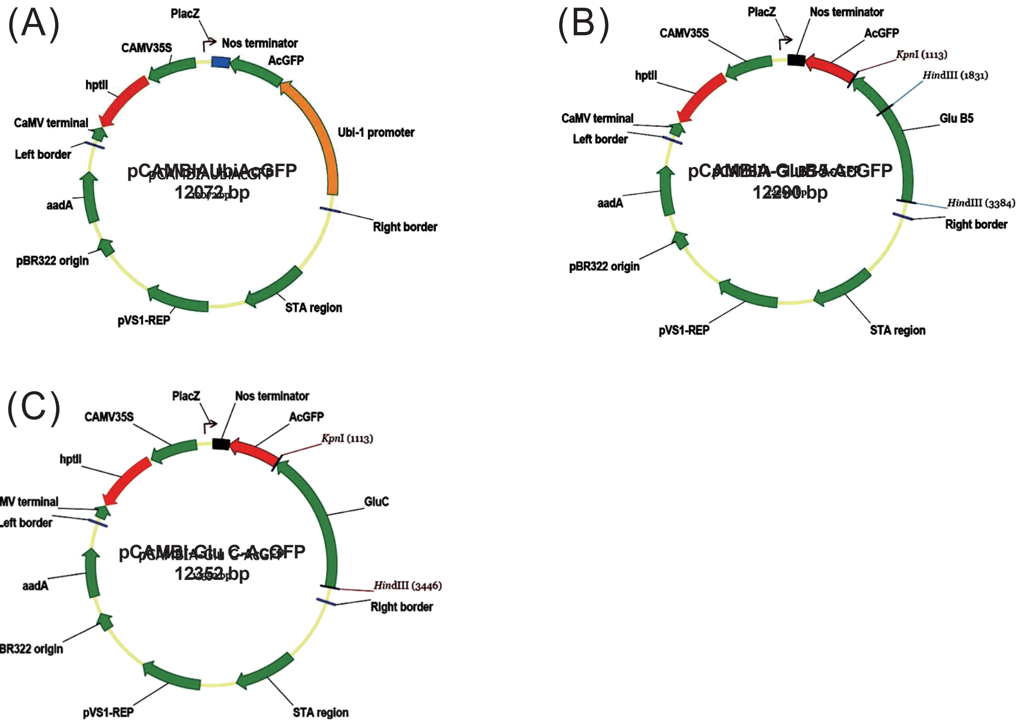

圖 2. 啟動子活性分析之構築。(A) pCAMBIAUbiAcGFP 構築；(B) pCAMBIAGluB5AcGFP 構築；(C) pCAMBIAGluCAcGFP 構築。

Fig. 2. The constructs for the activity analysis of promoters. (A) The construct of pCAMBIAUbiAcGFP; (B) The construct of pCAMBIAGluB5AcGFP; and (C) The construct of pCAMBIAGluCAcGFP.

農桿菌媒介轉形 (*Agrobacterium* mediated transformation)

本研究依中興大學分子生物學研究所陳良築教授所建立的方法 (Wang 2007)，進行水稻的基因轉殖。首先取水稻乳熟期的未熟胚 (約 18 DAP) ，經消毒後，播種於 CIM 固體培養基 (N6 鹽類及維生素、30 g L^{-1} 蔗糖、0.3 g L^{-1} 酪蛋白水解物、2 mg L^{-1} 2,4-D、2.2 g L^{-1} gelrite 及 pH 5.7) 。於 30℃全日照下，誘導癒傷組織的生成，以作為轉殖的材料。所得之癒傷組織，進行 *A. tumefaciens* EHA105 (pCAMBIA35SAcGFP、pCAMBIA35SZsGFP、pCAMBIAUbi1AcGFP、pCAMBIAGluB5AcGFP 及 pCAMBIAGluCAcGFP) 的感染。並依序經由共培養、感染、清洗等步驟後，即置於 2N6-C 固體培養基 (N6 鹽類及維生素、30 g L^{-1} 蔗糖、2.8 g L^{-1} 脯氨酸、1 g L^{-1} 酪蛋白水解物、2 mg L^{-1} 2,4-D、2.3 g L^{-1} gelrite 及 pH 5.7) 上，培養 4 d。再移至新的 RSCH 培養基 (MS 鹽類及維生素、30 g L^{-1} 蔗糖、30 g L^{-1} 山梨糖醇、2 g L^{-1} 酪蛋白水解物、2 mg L^{-1} Kinetine、0.02 mg L^{-1} NAA、4 g L^{-1} gelrite 及 pH 5.7，消毒後加入 50 mg L^{-1} hygromycin 與 500 mg L^{-1} cefotaxime) 上，於 30℃全日照下，進行再生與篩選。每 2 wk 進行繼代培養，直至癒傷組織出現綠點產生抗性植株，移至 50 mg L^{-1} hygromycin 的 RS medium (MS 鹽類及維生素、30 g L^{-1} 蔗糖、30 g L^{-1} 山梨糖醇、2 g L^{-1} 酪蛋白水解物、2 mg L^{-1} Kinetin、0.02 mg L^{-1} NAA、4 g L^{-1} gelrite 及 pH 5.7，消毒後加入 50 mg L^{-1} hygromycin) 再生試管中，進行健化培養。待植株株高約為 10–20 cm 時，方移出培養試管。擬轉殖株以無菌土栽種於生長箱，進行馴化，待其生長健壯後，便移至溫室待其抽穗結實，分株收集 T_1 種子。

水稻擬轉殖系之綠螢光蛋白質觀察、分子檢測與農藝性狀調查

共培養階段後，癒傷組織於不同培養時間，利用螢光解剖顯微鏡 (Zeiss Stemi SV6, Carl Zeiss)，觀察綠螢光蛋白質表現情形。螢光部分的照射光源為 470–490 nm 的藍光，激發的螢光則經由 505–530 nm 濾鏡過濾後，進入接目鏡呈像。最後，觀測影像再利用數位相機 (Nikon 995) 進行拍攝記錄。

再生後的擬轉殖植株小苗，經馴化 (Acclimation) 後，即移入農業試驗所生物技術組之基因隔離溫室繼續種植，並於不同生育期，觀察轉殖水稻不同組織綠螢光蛋白質表現情形。在最高分櫱期，採取葉片，進行基因組 DNA 製備，並以 DNA 聚合酶鏈鎖反應，分析綠螢光基因的導入情形，並於成熟期，調查株高及分櫱數等農藝性狀，並進行全株拍照記錄，成熟時，單株收穫種子。農藝性狀調查結果，進一步利用 SAS 13.2 統計分析軟體 (SAS Inst. Inc. 2014) 進行完全隨機設計 (complete randomized design; CRD) 之單因子變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 及 Fisher 之最小顯著差異性測驗 (Fisher's protected least significant difference test; LSD test)，以比較各轉殖系間在株高與分櫱上的差異。

結果與討論

綠螢光基因表現系統之構築與水稻轉殖

AcGFP 及 *ZsGFP* 兩新型綠螢光基因，自發表及 Clontech Co. 發展為產品至今，仍未在植物系統中被應用。本試驗首先構築 *35S* 啟動子驅動這兩個綠螢光基因之表現系統。其中，表現系統的 *35S* 啟動子及 *NOS* 終止子片段來自於 pUC35SIN 質體，先自 pAcGFP1 與 pZsGreen 質體，分別以 PCR 方法，增殖出 874 bp *AcGFP* 及 850 bp *ZsGFP* DNA 片段，並次選殖於 pUC35SIN，以獲得帶有 *35S* 啟動子 - 綠螢光基因 -*Nos* 終止子的 pUC35SAcGFP 及 pUC35SZsGFP。接著，利用 PCR 分別增殖 *35S* 啟動子-*AcGFP-Nos* 終止子 (2,028 bp) 及 *35S* 啟動子-*ZsGFP-Nos* 終止子 (2,000 bp) 的 DNA 片段，次選殖於 pCAMBIA1300，得到 pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP (圖 1) 。由於 *35S* 啟動子為連續大量表現且無組織專一性的啟動子 (Odell *et al*. 1985)。因此，*35S*::*AcGFP* 及 *35S*::*ZsGFP* 這兩個綠螢光基因表現的構築，應無需任何誘導物，即可在植物的各組織中，表現綠螢光蛋白質。

完成上述構築，並轉形後，利用「台農 67 號」未成熟胚 (圖 3A) 誘導產生的癒傷組織為材料 (圖 3B)，以 *A. tumefaciens* EHA105 (pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP) 感染水稻癒傷組織 (圖 3C)。經感染的癒傷組織再以 50 mg L^{-1} hygromycin 進行篩選及繼代 (圖 3D 及 E)，直至出現綠點產生抗性植株 (圖 3F)，再轉移至試管培養至 2–3 葉齡階段後 (圖 3G)，即進行健化培養，然後移種至基因隔離溫室種植 (圖 3H)。本試驗初期，以 100 個誘導的癒傷組織作為起始材料，最後分別取得 3 株 *35S*::*AcGFP* 擬轉殖系及 3 株 *35S*::*ZsGFP* 擬轉殖株，轉殖效率約 3–5%。最後以這些轉殖系癒傷組織及植株作為綠螢光基因表現分析的材料。

綠螢光蛋白質之表現與評估

抽取上述擬轉殖系的基因組 DNA，並利用 PCR 分析鑑定轉殖植株。在螢光基因的部分，以 GFP-F 及 GFP-R 引子(表 1)，針對 T_0 世代水稻擬轉殖系進行 PCR 分析，若植株確實為轉殖系，PCR 結果會增殖出約 800 bp 的片段。另外，在抗生素抗性基因 (*HPT*) 部分，以 HGTII-F 及 HGTII-R 引子 (表 1)，針對 T_2 世代水稻擬轉殖系進行 PCR 分析，若植株確實為轉殖系，PCR 結果會增殖出約 556 bp 的片段。結果顯示，3 株系 *35S*::*AcGFP* 及 3 株系 *35S*::*ZsGFP* (T_2 世代) 擬轉殖株皆可偵測出目標螢光基因及抗生素抗性基因的 DNA 片段 (圖 4)，而對照組葉片 DNA 則沒有訊號。由此證明，這些擬轉殖株皆為正確的轉殖系。

在水稻轉形過程，經感染癒傷組織在含有 50 mg L^{-1} hygromycin 的再生培養基上，培養 2 wk 後，*35S*::*AcGFP* 及 *35S*::*ZsGFP* 轉殖系的癒傷組織在螢光顯微鏡下，即能觀察到可被激發出綠色螢光的癒傷組織 (圖 5)，此結果顯

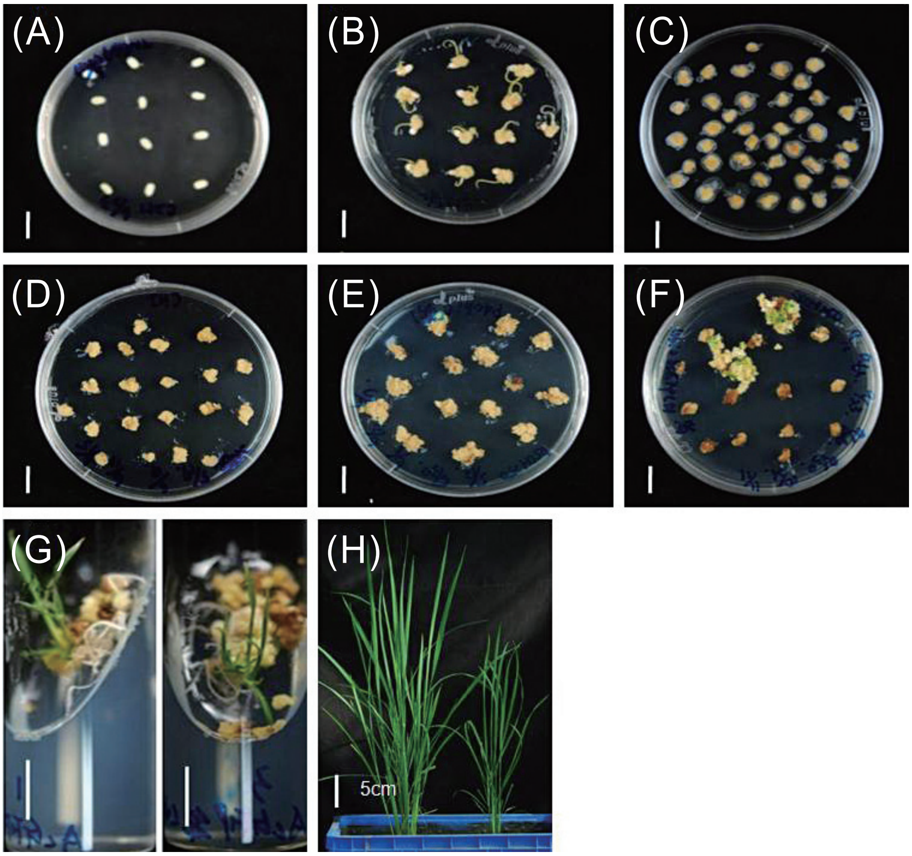

圖 3. 水稻轉殖流程。(A) 未成熟胚癒傷組織誘導；(B) 轉殖用之癒傷組織；(C) 共培養；(D) 及 (E) 篩選及再生；(F) 抗性之癒傷組織出現綠點；(G) 再生成為轉殖植株；(H) 馴化栽種 [(A) 至 (G)，bar = 1 cm；(H)，bar = 5cm]。

Fig. 3. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice. (A) Induction of callus from immature embryos; (B) The calli used as explants; (C) Co-cultivation; (D and E) Selection and regeneration; (F) Resistance calli with the appearance of green point; (G) Regeneration of transgenic plants; and (H) Acclimatization of the regenerated plants (A to G, bar = 1 cm; H, bar = 5 cm).

示這兩基因均可在水稻細胞內正常表現，並具有功能。進一步比較兩螢光蛋白的表現情形，結果發現 *35S*::*AcGFP* 轉殖系的螢光表現的亮度遠強於 *35S*::*ZsGFP* 轉殖系 (圖 5)。另一方面，收集經 PCR 確認之 T_1 種子，以 2.5% 次氯酸鈉消毒後，播種於 50 mg L^{-1} hygromycin MS 固態培養基。於全光照、30℃下培養 14 d，觀察轉殖系植株之螢光表現情形，結果發現在 *35S*::*AcGFP* 轉殖系苗期的胚盤及根部等組織，具有明顯的螢光表現，而 *35S*::*ZsGFP* 轉殖系則在苗期的胚盤及胚乳表面糊粉層等組織，具有微弱的螢光表現 (圖 5)。結果顯示 *35S*::*AcGFP* 轉殖植株的螢光表現亦強於 *35S*::*ZsGFP* 轉殖植株 (圖 5)。然而，有學者提出 AcGFP 的螢光亮度相當於 EGFP，而 ZsGFP 的螢光亮度則相當於 2.5 倍 EGFP (Matz *et al*. 1999; Gurskaya *et al*. 2003)。前述癒傷組織及 T_1 植株的觀察結果，均與上述與學者的發現有所出入。因此，*35S*::*ZsGFP* 表現系統的低效率表現，仍須進一步的試驗分析，方能釐清是在轉錄或是轉譯層級的調控所造成。

另一方面，*35S*::*AcGF*P 及 *35S*::*ZsGFP*

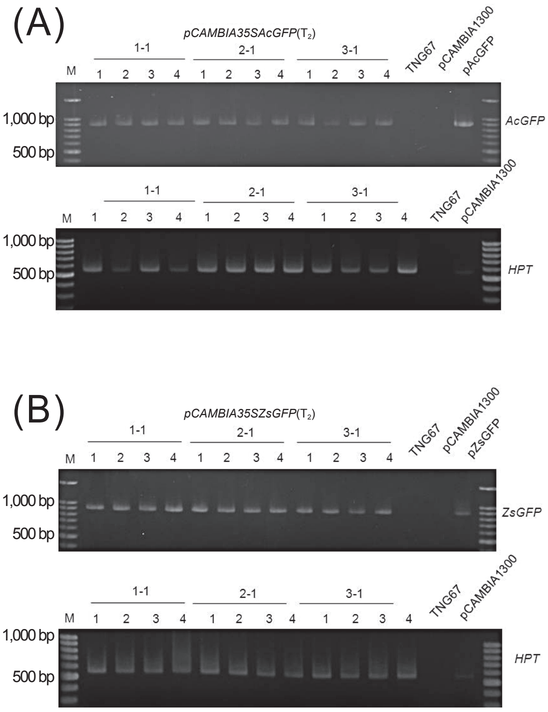

圖 4. 轉殖系螢光基因及抗生素抗性基因之 PCR 分析。(A) *35S*::*AcGFP* 轉殖系 (T_2)；(B) *35*S::*ZsGFP* 轉殖系 (T_2)。

Fig. 4. Screening of transgenic lines by PCR analysis of *GFP* and antibiotic resistance genes. (A) *35S*::*AcGFP* transgenic lines (T_2); (B) *35S*::*ZsGFP* transgenic lines (T_2).

轉殖系的螢光表現，主要是在癒傷組織、胚盤 (scutellum)、根部或是胚乳表面的糊粉層 (aleurone layer) (圖 5)。但是在芽鞘及幼葉則未觀察到螢光，可能是因為在這些組織綠螢光蛋白質的觀察，受到葉綠素的干擾，而癒傷組織、根部、胚盤及胚乳等部位則因無葉綠素，因此較容易進行觀察。在本試驗中，所用螢光顯微鏡的濾鏡為 505–530 nm，而 AcGFP 及 ZsGFP 綠螢光蛋白質激發的螢光波長，分別為 505 nm 及 506 nm (Matz *et al*. 1999; Gurskaya *et al*. 2003)。所以，後續的實驗應用，或可以利用波長範圍較窄的濾鏡，避免葉綠體的螢光干擾，以改善 AcGFP 及 ZsGFP 綠螢光蛋白質在含葉綠體組織的觀察。

T_2 世代各轉殖系間在株高與分櫱上的差異顯著性分析結果，如表 2 所示，發現 *35S*::*AcGFP* 3-1 轉殖系之株高與分櫱數皆顯著低於對照品系 ‘TNG67’ 及 pCAMBIA1300 轉殖系，但 *35S*::*ZsGFP* 2-1 及 3-1 轉殖系的株高則皆顯著高於對照品系 ‘TNG67’，而 *35S*::*ZsGFP* 3-1 轉殖系的分櫱數也顯著高於對照品系 ‘TNG67’；除了 *35S*::*ZsGFP* 2-1 外，所有轉殖系的分櫱數亦皆顯著低於 pCAMBIA1300 轉殖系。這些結果可推導綠螢光基

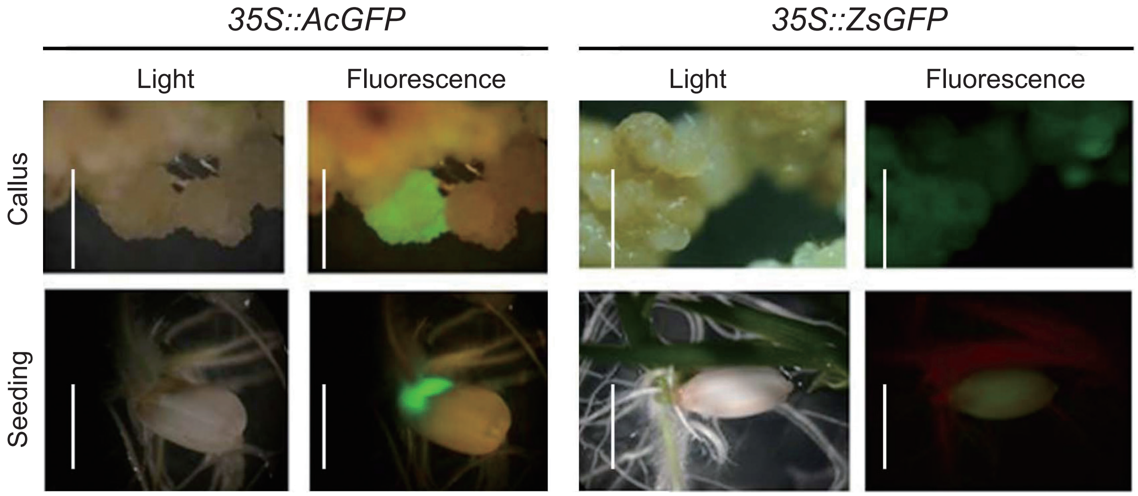

圖 5. 轉殖系之再生癒傷組織及發芽種子的螢光表現情形。

Fig. 5. GFP fluorescence in the regenerated calli and seedlings of transgenic lines. Light and GFP indicate images captured using light and fluorescence microscopy, respectively (Bar = 0.5 cm, n ≧ 3).

表 2. 綠螢光基因轉殖系與對照品系 'TNG67' 農藝性狀之評估。

Table 2. Evaluation of agronomic traits of the green fluorescent protein genes and 'TNG67' rice.

Constructs	Line no.	Plant height (cm)	Tillering no. (plant)
35S::AcGFP	1-1	120.25 ± 13.30 abc [z]	3.75 ± 1.50 cd
	2-1	111.50 ± 6.24 c	4.50 ± 1.29 cd
	3-1	101.50 ± 1.00 d	3.50 ± 0.58 d
35S::ZsGFP	1-1	117.00 ± 5.35 bc	5.00 ± 0.82 cd
	2-1	122.00 ± 3.92 ab	8.75 ± 1.26 ab
	3-1	126.00 ± 3.16 a	7.50 ± 0.58 b
pCAMBIA1300		111.50 ± 3.32 c	9.75 ± 1.89 a
TNG67		112.25 ± 3.77 c	5.25 ± 0.96 c

[z] Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

因 -*AcGFP* 及 *ZsGFP* 基因的導入，確實會造成水稻外表性狀的改變。此現象可能肇因於目標基因片段的插入，造成插入位點基因的破壞或改變其表現，進而導致株高及分櫱數的改變 (即所謂的位置效應)。但此結論仍須進一步將插入位點基因序列選殖出來後，進行功能分析與基因表現分析，方能定論。

綜合上述結果，本研究所構築的綠螢光基因表現系統，除了可在水稻細胞中表現具功能的綠螢光蛋白質外，亦不會因綠螢光蛋白質的產生而影響水稻植株的正常生長。另一方面，本表現系統於構築時，即在啟動子及綠螢光基因區域，設計一多重選殖位置 (multiple cloning site; MCS)， 包含 *Hin*dIII、*Pst*I、*Sal*I、*Bam*HI、*Sma*I、*Xma*I 及 *Kpn*I 等限制酶切位 (圖 1) ，可供其它重要基因後續在細胞標定 (cell labeling) 、啟動子活性評估 (promoter assay) 或次細胞定位 (subcellular localization) 探討等功能分析試驗。

玉米 *Ubi-1* 及水稻胚乳專一性啓動子活性評估

啟動子可以控制特定基因表現的起始時間、位置和強度，是建構表現系統或生物反應器不可或缺的元件。另一方面，前述實驗發現 *AcGFP* 綠螢光基因在水稻細胞中有極佳的螢光表現。因此，本試驗利用 *AcGFP* 綠螢光基因分析玉米 *Ubi-1* 啟動子及水稻胚乳專一性啟動子 *GluB5* 及 *GluC* 啟動子在水稻細胞中的活性。前者為一連續式表現的強啟動子 (Christensen & Quail 1996)，而後兩者則是胚乳專一性表現的啟動子 (Mitsukawa *et al*. 1998; Kusaba *et al*. 2003)。

先自 pEpyon-42H 質體以 PCR 增殖出 2,028 bp *Ubi-1* 啟動子 DNA 片段，並次選殖於 pUC35SIN，以獲得帶有 *Ubi-1* 啟動子 pUCUbiIN。再自 pAcGFP1 增殖出 874 bp AcGFP DNA 片段，並次選殖於 pUCUbiIN，以獲得帶有 *Ubi-1* 啟動子 -*AcGFP* 基因 -*Nos* 終止子的 pUCUbiAcGFP 載體。接著，繼續利用 PCR 方法，自 pUCUbiAcGFP 增殖 *Ubi-1-AcGFP-Nos* 之 DNA 片段 (3,170 bp) ，並次選殖於 pCAMBIA1300，得到 pCAMBIAUbiAcGFP (圖 2A) 。經農桿菌媒介轉形法，將 *Ubi-1::AcGFP* 基因片段導入水稻基因組，結果發現除了在感染的癒傷組織中可發現螢光表現外，亦可於再生的芽體發現螢光表現 (圖 6)。經由癒傷組織、再生芽體或根部組織的螢光表現，可發現 *Ubi-1* 啟動子的轉殖系 *Ubi-1::AcGFP* 較含 35S 啟動子的轉殖系 *35S::AcGFP* 強。上述的觀察結果，均取 3 個以上樣品進行觀察所得之一致性結果，再取具代表的樣品進行拍照記錄。此外，螢光在轉殖系各部位表現，顯示玉米 *Ubi-1* 啟動子為一非組織專一性且為持續表現的強啟動子。

另一方面，依據學者發表的序列設計引子，並以 PCR 方法自水稻「台農 67 號」增殖出 2,280 bp *GluB5* 及 2,340 bp *GluC* 啟動子 DNA 片段，再次選殖於 pGEM-T-Easy 載體

後，進行序列分析，結果發現「台農 67 號」的 *GluB5* 及 *GluC* 啟動子序列，與學者發表的序列具有 100% 的一致性 (Mitsukawa *et al*. 1998; Kusaba *et al*. 2003)。進一步以 PCR 分別自 pGEMGluB5 及 pGEMGluC， 增殖出 2,280 bp *GluB5* 及 2,340 bp *GluC* 啟動子片段，並次選殖於 pCAMBIAUbiAcGFP，以置換其上 *Ubi-1* 啟動子片段，而得 pCAMBIA-GluB5AcGFP 及 pCAMBIAGluCAcGFP (圖 2B, C)。接著，利用農桿菌媒介轉形法，分別將 *GluB5*::*AcGFP* 及 *GluC*::*AcGFP* 基因片段導入水稻基因組，結果發現 *GluB5*::*AcGFP* 及 *GluC*::*AcGFP* 轉殖系在感染的癒傷組織、再生芽體、根部組織及胚乳中皆可發現螢光 (圖 6)。因此，藉由螢光的觀察，發現水稻胚乳專一性表現的啟動子並不侷限於胚乳，於癒傷組織、再生芽體、根部組織也都有明顯的表現。同時證明不同啟動子皆能驅動螢光蛋白，並能表現於不同的組織。

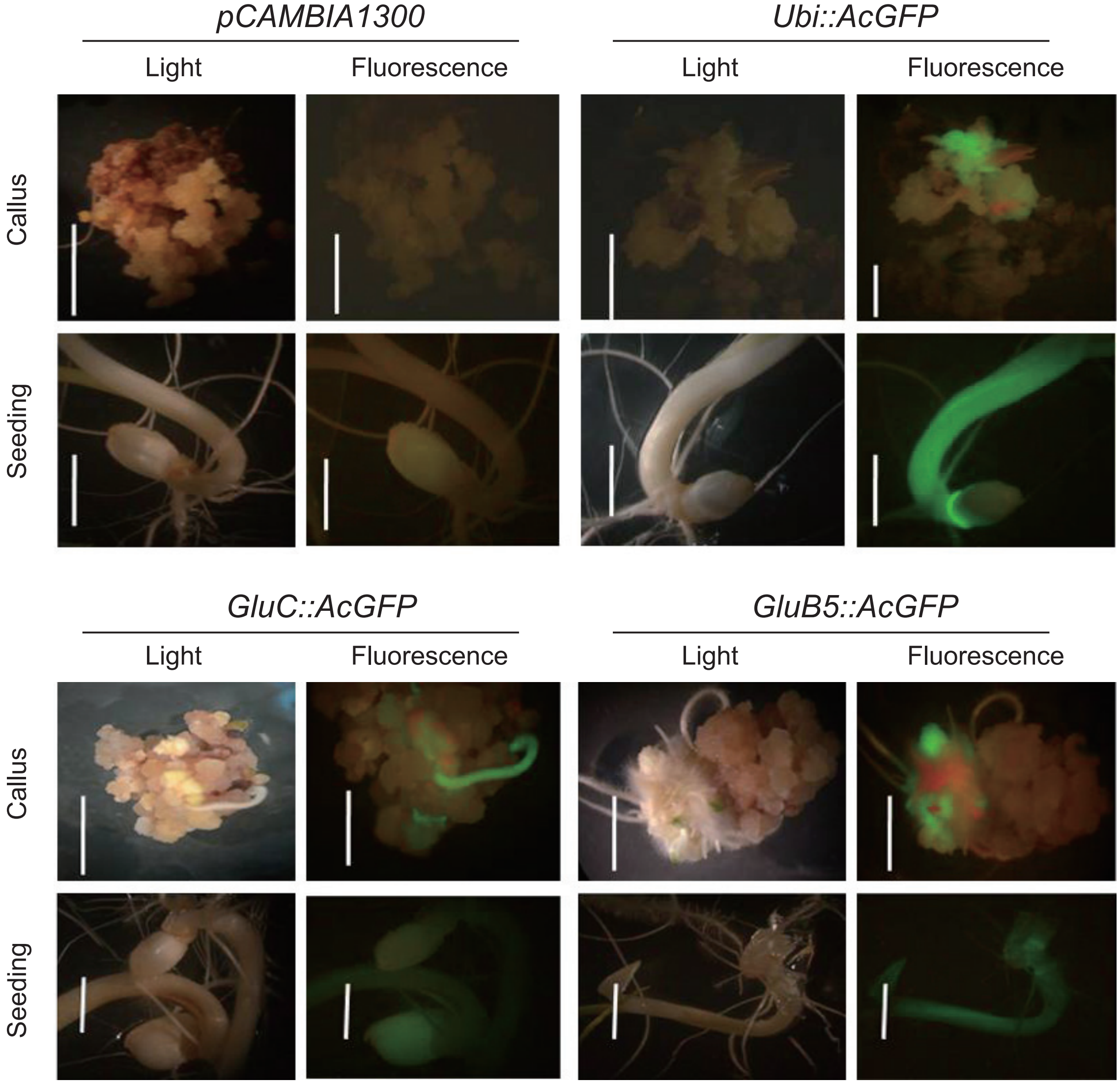

圖 6.　啟動子活性分析轉殖系之再生癒傷組織及發芽種子的螢光表現情形。

Fig. 6.　GFP fluorescence in the regenerated callus and seedlings of transgenic lines for promoter (Bar = 0.5 cm, n ≧ 3).

結論

本研究利用 *35S* 啟動子來驅動 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 綠螢光基因，建構植物基因轉殖之報導基因系統，作為建構相關基因表現系統之基礎。由於 *35S* 啟動子具有持續表現的特性，在各組織均能表現螢光 (Odell *et al*. 1985)。因此，可藉由螢光的觀察，提早確認轉殖是否成功，縮短轉殖篩選所需的時間，並減少成本和人力的投入提高整體的轉殖效率。尤其，本研究利用上述兩螢光基因表現系統，於轉殖 2 wk 後，即可經由螢光顯微鏡觀察到經抗生素篩選再生的癒傷組織觀察到綠色螢光。而利用篩選基因 *HPT* (hygromycin phosphotransferase) 基因，來篩選轉殖與非轉殖的植物細胞或組織，得到再生植株後，利用 PCR 檢測確認是否為轉殖植株，要耗費 6–12 wk 才能證實轉殖結果。因此，*AcGFP* 及 *ZsGFP* 綠螢光基因可在水稻細胞中表現具功能的綠螢光蛋白質，確實可縮短篩選所需的時間。此外，本研究進行玉米 *Ubi-1* 及水稻胚乳專一性啟動子 (*GluB5* 及 *GluC*) 活性之比較分析，發現這些啟動子均可在水稻細胞中啟動 *AcGFP* 螢光基因的表現，顯示這些啟動子均能正常驅動異源基因，可應用於其它功能基因表現系統的建構。綜合這些研究成果，本研究建構 *35S* 啟動子驅動 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 綠螢光基因及不同啟動子驅動 *AcGFP* 基因等表現系統，可作為植物轉殖的早期篩選標誌，應用於協助較具挑戰性之植物轉殖平台的建立。本研究室已應用這些表現系統，協助建立秈稻及大豆等基因轉殖平台的相關試驗。另一方面，本表現系統於構築時，即在啟動子及綠螢光基因區域間，設計一多重選殖位置，可供日後其它重要基因在細胞標定、啟動子活性評估或次細胞定位置之探討等功能分析之應用。

引用文獻

Bolhassani, A., T. Taheri, Y. Taslimi, S. Zamanilui, F. Zahedifard, N. Seyed, F. Torkashvand, B. Vaziri, and S. Rafati. 2011. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. Exp. Parasitol. 127:637–645.

Christensen, A. H. and P. H. Quail. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. Transgenic Res. 5:213–218.

Chudakov, D. M., V. V. Verkhusha, D. B. Staroverov, E. A. Souslova, S. Lukyanov, and K. A. Lukyanov. 2004. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. Nat. Biotechnol. 22:1435–1439.

Errampalli, D., K. Leung, M. B. Cassidy, M. Kostrzynska, M. Blears, H. Lee, and J. T. Trevors. 1999. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. J. Microbiol. Meth. 35:187–199.

Fraley, R. T., S. G. Rogers, R. B. Horsch, P. R. Sanders, J. S. Flick, S. P. Adams, M. L. Bittner, L. A. Brand, C. L. Fink, J. S. Fry, G. R. Galluppi, S. B. Goldberg, N. L. Hoffmann, and S. C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803–4807.

Gurskaya, N. G., A. F. Fradkov, N. I. Pounkova, D. B. Staroverov, M. E. Bulina, Y. G. Yanushevich, Y. A. Labas, S. Lukyanov, and K. A. Lukyanov. 2003. A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants. Biochem. J. 373:403–408.

Haseloff, J., K. R. Siemering, D. C. Prasher, and S. Hodge. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2122–2127.

Heim, R., A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien. 1995. Improved green fluorescence. Nature 373(6516):663–664.

Heim, R., D. C. Prasher, and R. Y. Tsien. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12501–12504.

Heim, R. and R. Y. Tsien. 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. Curr. Biol. 6:178–182.

Hood, E. E., S. B. Gelvin, L. S. Melchers, and A. Hoekema. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Res. 2:208–218.

Hu, W. and C. L. Cheng. 1995. Expression of Aequorea green fluorescent protein in plant cells. FEBS lett. 369:331–334.

IRGSP. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793–800.

Jach, G., E. Binot, S. Frings, K. Luxa, and J. Schell. 2001. Use of red fluorescent protein from Discosoma sp.

(dsRED) as a reporter for plant gene expression. Plant J. 28:483–491.

Jain, R. K., P. B. Joyce, M. Molinete, P. A. Halban, and S. U. Gorr. 2001. Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells. Biochem. J. 360:645–649.

Kusaba, M., K. Miyahara, S. Iida, H. Fukuoka, T. Takano, H. Sassa, M. Nishimura, and T. Nishio. 2003. Low glutelin content1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. Plant Cell 15:1455–1467.

Labas, Y. A., N. G. Gurskaya, Y. G. Yanushevich, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov, and M. V. Matz. 2002. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:4256–4261.

Lukyanov, K. A., A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya, M. V. Matz, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, M .L. Markelov, A. G. Zaraisky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan, and S. A. Lukyanov. 2000. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. J. Biol. Chem. 275:25879–25882.

Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. Nat. Biotechnol. 17:969–973.

Matz, M. V., K. A. Lukyanov, and S. A. Lukyanov. 2002. Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. Bioessays 24:953–959.

Mitsukawa, N., H. Hayashi, K. Yamamoto, K. Kidzu, R. Konishi, T. Masumura, and K. Tanaka. 1998. Molecular cloning of a novel glutelin cDNA from rice seeds. Plant Biotechnol. 15:205–211.

Niedz, R. P., M. R. Sussman, and J. S. Satterlee. 1995. Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. Plant Cell Rep. 14:403–406.

Odell, J. T., F. Nagy, and N. H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter. Nature 313:810–812.

SAS Institute Inc. 2014. SAS/STAT 13.2 User's Guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 9411 pp.

Sheen, J., S. Hwang, Y. Niwa, H. Kobayashi, and D. W. Galbraith. 1995. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. Plant J. 8:777–784.

Stewart, C. N. 2001. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. Plant Cell Rep. 20:376–382.

Verkhusha, V. V. and K. A. Lukyanov. 2004. The molecular properties and applications of *Anthozoa* fluorescent proteins and chromoproteins. Nat. Biotechnol. 22:289–296.

Wang, I. W. 2007. Expression of the Pharmaceutical Enzyme L-aminoacylase in Transgenic Rice. Master Thesis, Graduate College of Life Science, National Chung Hsing University. Taichung. 70 pp. (in Chinese with English abstract)

Wenck, A., C. Pugieux, M. Turner, M. Dunn, C. Stacy, A. Tiozzo, E. Dunder, E. van Grinsven, R. Khan, M. Sigareva, W. C. Wang, J. Reed, P. Drayton, D. Oliver, H. Trafford, G. Legris, H. Rushton, S. Tayab, K. Launis, Y. F. Chang, D. F. Chen, and L. Melchers. 2003. Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. Plant Cell Rep. 22: 244–251.

Wu, Y. Y., Y. R. Chou, C. S. Wang, T. H. Tseng, L. J. Chen, and J. T. C. Tzen. 2009. Different effects on triacylglycerol packaging to oil bodies in transgenic rice seeds by specifically eliminating one of their two oleosin isoforms. Plant Physiol. Biochem. 48:81–89

Yang, T. T., L. Cheng, and S. R. Kain. 1996. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. Nucleic acids Res. 24:4592–4593.

Expression, Evaluation and Application of Novel Green Fluorescent Protein Genes, *AcGFP* and *ZsGFP*, in Rice

Yi-Wen Wang[1], Hui-Chen Lai[2], Hsiao-Ying Hsieh[2], Chang-Sheng Wang[3,*], and Da-Gin Lin[4,*]

Abstract

Wang, Y. W., H. C. Lai, H. Y. Hsieh, C. S. Wang, and D. G. Lin. 2014. Expression, evaluation and application of novel green fluorescent protein genes, *AcGFP* and *ZsGFP*, in rice. J. Taiwan Agric. Res. 63(4):307–319.

The aim of this study is to construct novel expression system driving reporter genes, *AcGFP* and *ZsGFP*, for functional evaluation of rice genes. Two constructs, pCAMBIA35SAcGFP and pCAMBIA35SZsGFP, were completed and then introduced into rice genomes by *Agrobacterium*-mediated transformation. The results displayed that the transformed calli of two transgenic lines present green fluorescence after culture for 14 days. The radicles and roots of *35S*::*ZsGFP* lines presented green fluorescence in the seed lings at 14 days after germination. At the same time, the radicles and endosperm aleurone layer of *35S*::*ZsGFP* lines also displayed green fluorescence. However, the coleoptiles and spires of two transgenic lines did not be observed green fluorescence since the interference of chlorophyll fluorescence. The *35S*::*ZsGFP* lines showed stronger fluorescence than those of *35S*::*ZsGFP* since the poor expression efficiency of *35S*::*ZsGFP* system. Finally, *AcGFP* was applied to analyze the activities of maize *Ubi-1*, rice *GluB5* and *GluC* promoters. The results displayed that transformed calli and shoots of *Ubi-1*::*AcGFP* lines could express green fluorescence. The transformed calli and shoots of *GluB5*::*AcGFP* and *GluC*::*AcGFP* lines also expressed green fluorescence. These results suggest that maize *Ubi-1*, rice *GluB5* and *GluC* promoters could drive *AcGFP* and produce functional fluorescent proteins. Therefore, the expression systems established in this study can provide as selectable markers in the initial stages of plant transformation and are applicable in the development of transgenic platforms and functional analysis of plant genes.

Key words: Green fluorescent protein gene, Reporter, Promoter, Expression system, *Agrobacterium*-mediated transformation, Rice.

Received: August 4, 2014; Accepted: October 14, 2014.

* Corresponding authors, email: wangchansen@nchu.edu.tw and dagin@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Associate Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 63(4):320–323 (2014)
DOI: 10.6156/JTAR/2014.06304.08

「台農 4 號 (紅玉)」桃之育成

溫英杰 [1,*] 張靜誼 [2]

摘要

溫英杰、張靜誼。2014。「台農 4 號 (紅玉)」桃之育成。台灣農業研究 63(4):320–323。

「台農 4 號 (紅玉)」桃為適合台灣中部以北低海拔地區種植之低需冷性桃新品種。「紅玉」桃樹勢強健，樹形開展；花為薔薇形、有花粉能自花結實。台灣中部低海拔地區 1 月中旬開花，4 月下旬至 5 月上旬果實成熟。果實圓形、中大，平均果重 96 g，果皮 95% 著暗紅色；果肉白色、味甜、低酸、不溶質，硬度佳，黏核。

關鍵詞：低需冷性、低酸、不溶質。

桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch] 果實成熟時依其質地可分為溶質、不溶質及硬肉 3 種 (Yoshida 1976; Scorza & Sherman 1996)。台灣高海拔種植的桃子如中津、白鳳等大多數品種，以及平地種植的桃品種如台農甜蜜等皆為溶質果肉，乃國人常稱的水蜜桃，溶質果肉因為在加工過程中遇到高溫加熱時會崩解不成形故名。溶質性的水蜜桃採收及運銷時因碰撞而致商品價值降低或喪失者，約佔總生產果實數量 10%，比例相當高。溶質水蜜桃成熟時如因採收不及或因產銷失衡導致市場去化不良，也會使水蜜桃採收時過熟，果肉太軟而在拍賣市場遭到淘汰，以上這些原因都會造成農民直接的損失。桃子因果實生育期短，不論栽種在高海拔或低海拔，遭遇颱風危害的機會較梨、蘋果或甜柿的機會小，預期桃栽培面積有擴大的可能，育成栽培容易、農民獲利高的桃品種係育種者的職責。

「台農 4 號 (紅玉)」桃 (Ruby) 係於 2003 年由 2000 年以 12-3 與 Fla.90-24C 之雜交後代中選出，編號 92-4。12-3 果實大，但果肉軟、果皮薄且著色差，因此利用 Fla.90-24c 果肉不溶質且果皮著色佳的特性，將兩者雜交期能選出果實大、著色佳且硬度高的雜交後代，92-4 符合設定之育種目標因而中選。2004–2006 年於南投縣信義鄉羅娜種原保存園以 91-1、91-2、91-3、91-5、92-1、92-4、92-5 七個品系嫁接於 2 年生苦桃砧木上，進行品系比較試驗，對照組為「台農甜蜜」桃 (Premier)、12-3 及 Fla.90-24C。結果以 91-5、92-4、92-5 三個品系果實品質及樹勢均佳，表現最優，91-1、91-2、92-1 因果皮薄，損傷率高，91-3 因部分成熟果實仍有澀味同遭淘汰。91-5 及 92-5 成熟期在 6 月中旬，易遭果實蠅危害，亦不推薦農友種植。2007–2009 年將 92-4 嫁接在 2 年生苦桃砧木上，定植於台中市東勢區進行區域試驗。因具有以往低海拔地區栽培桃品種沒有的特性 果肉不溶質及果皮著色佳 (圖 1、2)，受到農民歡迎，乃於 2010 年申請植物品種權 (Tsai & Li 2010)，並授權給台中市東勢區農會。「紅玉」桃譜系如圖 3。

「紅玉」桃樹勢強、樹形開張；薔薇型花、有花粉且活性高；葉柄蜜腺形狀為腎形；果形圓形且對稱、中等大小，平均果重 96 g，果窪淺，果皮著色範圍約 95%、顏色暗紅，果毛短，果肉白色，不溶質，味甜，平均可溶性固形物含量達 13.3°Brix，平均可滴定酸含量 0.31%；果肉黏核，果核倒卵型，周圍的果肉沒有花青

投稿日期：2014 年 7 月 30 日；接受日期：2014 年 10 月 6 日。
* 通訊作者：icwen@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所作物種原組研究員兼組長。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所作物種原組前研究助理。台灣 台中市。

圖 1. 「紅玉」桃果實剖面圖。

Fig. 1. The fruit sectional view of peach cultivar ‘Tainung No.4 (Ruby)’.

圖 2. 「紅玉」桃樹上著果情形。

Fig. 2. The fruits set of peach cultivar ‘Tainung No.4 (Ruby)’.

素著色。「紅玉」開花期在 1 月中旬，與佛羅里達品種 ‘Flordred’ 同時，推估冬季休眠所需低溫時數約 100 chilling unit (cu)，台灣中部以北皆適合種植。果實 4 月下旬至 5 月上旬成熟，果肉為不溶質，9 分熟的「紅玉」桃以果實硬度測定器測量果實硬度為 3.5 kg cm^{-2}，遠高於 9 分熟水蜜桃硬度的 1.3 kg cm^{-2}。可以在 9 分熟或果實風味最佳之完熟期才行採收運銷，不但果實品質佳且耐儲運，可以減少農友包裝成本及降低損耗率，與「台農甜蜜」之特性比較如表 1。栽培管理與其他平地水蜜桃作業程序相同，病蟲害防治可參考植物保護手冊推薦用藥。其他特別注意事項如下：(1) 果實著暗紅色，硬熟期果實遭果實蠅叮咬不易區別出來，此類果實如上市販售，可能造成消費者買到果實蠅為害果，而失去再購買之動機，所以需加強果實蠅的防治；(2) 果實中等大小且著果率佳，放任結果或結果過多，果實容易偏小，適當疏果可以增加大果百分率，提高產品售價。

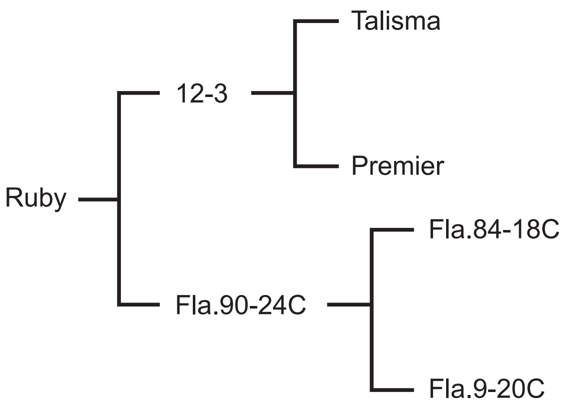

圖 3. 「台農 4 號 (紅玉)」桃譜系。

Fig. 3. Pedigree of peach cultivar 'Tainung No.4 (Ruby)'.

表 1. 「紅玉」桃與「台農甜蜜」桃在台灣中部低海拔植株、果實及果肉特性之表現。

Table 1. Comparison of tree and fruit characteristics of peach cultivars 'Ruby' and 'Premier' in the lowland area of Central Taiwan[z].

Characteristics	Ruby	Premier
Chilling unit (cu) [y]	100	125
Tree type	Spread	Semi-upright
Flower type	Showy	Showy
Fruit shape	Round	Oblong
Bloom date	Middle January	Late January
Ripen date	Early May	Middle May
Fruit development period (d)	113	111
Skin red color (%)	95	60
Average fruit weight (g)	96	81
Flesh color	White	White
Stone freeness	Cling	Free

[z] Based on data investigated in Tong-shih area, sea level of 400 m.
[y] Based on relative order and time of bloom.

引用文獻

Scorza, R. and W. B. Sherman. 1996. Chapter 7: Peaches. p.325–440. *in*: Fruit Breeding. Vol. 1. Tree and Tropical Fruits. (Janick, J. and J. N. Moore, eds.) John Wiley & Sons. Hoboken. 616 pp.

Tsai, Y. C. and S. H. Li. 2010. Tainung No.4-Ruby Peach. p.218–219. *in*: The Yearbook for Protection of New Plant Varieties in 2010. (Tsai, Y. C. and S. H. Li, eds.) Taiwan Seed Improvement and Propagation Station and Agriculture and Food Agency, Council of Agriculture. Taichung. 275 pp. (in Chinese and English abstract)

Yoshida, M. 1976. Genetic studies on the fruit quality of peach varieties. III. Texture and keeping quality. Bull. Fruit Tree Res. Stat., Ser. A3, 1–16. (in Japanese)

Breeding of Peach Cultivar 'Tainung No.4 (Ruby)'

Ien-Chie Wen[1,*] and Ching-Yi Chang[2]

Abstract

Wen, I. C. and C. Y. Chang. 2014. Breeding of peach cultivar 'Tainung No.4 (Ruby)'. J. Taiwan. Agric. Res. 63(4):320–323.

'Tainung No.4 (Ruby)' is a low-chill requiring peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] released for mild winter region such as Taiwan lowland area. Trees of 'Tainung No.4 (Ruby)' are vigorous and widespread. Flowers are self-fertile and showy. Normal bloom dates are middle January in the lowland area of Central Taiwan. Fruits are round with average weight of 96 g, 95% external deep red color, and medium-large size for the late April to early May maturity season. Flesh is white, non-melting, sweet with subacid and clings to the pit.

Key words: Low-chill, Subacid, Non-melting.

Received: July 30, 2014; Accepted: October 6, 2014.
[*] Corresponding author, e-mail: icwen@tari.gov.tw
[1] Research Fellow and Director, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Former Research Assistant, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台 灣 農 業 研 究

(原《中華農業研究》期刊)

第六十三卷　目次

第一期

研究報告

李奇峰、*Jan Bezděk*	台灣產翠螢金花蟲屬的分類回顧 (鞘翅目：金花蟲科：瑩金花蟲亞科)	1
謝靜敏、楊正釧、陳德旭、莊曜駿、王益真、李雅琳	苦茶籽帶殼與否及炒培處理之榨出油品質比較	17
林士閔、呂椿棠、卓緯玄、呂秀英	水稻生育階段預測模式之建立與驗證	30
張哲瑋、顏昌瑞、王婉伶、劉茂南、張仁育	荔枝新品種「台農7號 (早大荔)」之育成	43
蕭翌柱、陳冠文	未經冷馴化之草莓莖頂超低溫冷凍保存研究	57
黃守宏、林靜宜	鳳梨嫡粉介殼蟲之分布與防治及其他害蟲調查	68

研究簡報

李永民、劉碧鵑、顏昌瑞	小波羅蜜果實發育之研究	77
陳俊仁、姚銘輝、陳宣蘋、廖芳瑾	糧食生產評估系統之建置：以水稻生產為例	84

第二期

研究報告

陳健忠、鄭玲蘭、董耀仁、盧秋通、吳文哲、*John S. Yaninek*	應用基徵草蛉 (Neuroptera: Chrysopidae) 防治網室木瓜上神澤氏葉蟎 (Acari: Tetranychidae) 之研究	91
陳淑佩、翁振宇、吳文哲	農業試驗所昆蟲標本館雪盾介殼蟲亞科 (半翅目：胸喙亞目：介殼蟲總科：盾介殼蟲科) 標本名錄	105

林資哲、劉威廷、黃國益、宋濟民、李長沛、吳東鴻、賴明信	「台農67號」穀粒充實過程動態影像變化之研究	122
陳淑佩、翁振宇、吳文哲	台灣進口植物農產品檢出盾介殼蟲 (半翅目：介殼蟲總科：盾介殼蟲科)	129
蔡佳欣、安寶貞、呂昀陞、陳美德、黃淑苓、彭玉花	*Pseudomonas cichorii* 引起之番茄細菌性葉斑病	143
關政平、黃彥華、曾清山、林宗俊、石信德	使用Real-time PCR檢測引起西瓜蔓枯病菌的方法評估	151
羅淑卿、鍾佩恩	超高壓液相層析儀快速分析台灣蔬菜葉黃素之新方法	159
唐佳惠、蔡孟勳、蔡惠文、官青杉	鳳梨「台農21號 (黃金)」之育成	167

第三期

研究報告

鄭允、王志賢、黃毓斌、江明耀	瓜實蠅 [*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)] 中胸背板剛毛之數量遺傳機制	179
李奇峰	細角葉蚤屬的分類修訂 (鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科：葉蚤族) 標本名錄	188
羅淑卿、鍾佩恩	白芷 Cinnamate 4-hydroxylase 基因之選殖、功能性分析及8-氫化佛手柑內酯美白物質量產之研究	205
李瑋崧、呂昀陞、吳宗諺、蔡淑珍、陳美杏	台灣原生花臉香蘑 [*Lepista sordida* (Fr.) Singer] 之馴化	216
劉紹國、謝光照	超甜玉米鮮果穗產量及其它農藝性狀之遺傳分析	225
謝凱勛、林素汝、吳永培	薑科作物遺傳歧異度之分析	235

研究簡報

董耀仁、陳健忠	東方果實蠅 [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)] 乾式餌劑之耐雨及誘效持續性研究	249
黃肇家、黃慧穗、蔡金玉	*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ 蝴蝶蘭帶不同長度花梗株模擬海運日本對開花品質之影響	253

第四期

研究報告

關政平、曾清山、張文學、石信德、鄭櫻慧、鄧汀欽	應用核酸探針系統檢測瓜類褪綠黃化病毒	259
安寶貞、蔡志濃、王姻婷	台灣木瓜疫病菌配對型之分佈	267
陳麗鈴、安寶貞、蘇俊峯、楊正偉、蔡幸君、蔡志濃、謝廷芳	馬拉巴栗苗木疫病之防治藥劑篩選	274
鄧汀欽、林羿廷、蔡錦慧、廖吉彥、高瑞隆	台灣山藥上分離的蠶豆萎凋病毒2兩個株系之比較鑑定	282
曾清山、陳森車、關政平、杜元凱、陳涵葳、吳明哲	無線射頻辨識技術在基因轉殖作物生物安全管理之應用	291
郭介煒、郭素真、許育嘉、吳永培	以有機栽培模式選育優質水稻新品系可行性之評估	298
王怡雯、賴慧真、謝曉鶯、王強生、林大鈞	新型綠螢光基因*AcGFP*及*ZsGFP*在水稻之表現、評估與應用	307

研究簡報

溫英杰、張靜誼	「台農4號 (紅玉)」桃之育成	320

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Contents of volume 63

Number 1

Research Articles

Chi-Feng Lee and Jan Bezděk	Taxonomic Studies on the Genus *Apophylia* from Taiwan (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae)	1
Ching-Ming Hsieh, Jeng-Chuann Yang, De-Shiu Chen, Yao-Chun Chuang, Eugene I-Chen Wang, and Ya-Lin Lee	Effects of Roasting *Camellia tenuifolia* Seeds with/without Shells on the Quality of Seed Oil	17
Shih-Hong Lin, Chun-Tang Lu, Woei-Shyuan Jwo, and Hsiu-Ying Lu	Establishment and Validation of Prediction Model for Rice Growth Stages	30
Jer-Way Chang, Chung-Ruey Yen, Wan-Ling Wang, Mau-Nan Liu, and Jen-Yu Chang	Breeding of Novel Litchi Cultivar ‘Tainung No.7 (Early Big)’	43
Yih-Juh Shiau and Guan-Wen Chen	Study on the Cryopreservation of Non-cold Hardening *Fragaria* × *ananassa* Duch. Shoot Tips	57
Shou-Horng Huang and Ching-Yi Lin	Distribution and Control of Pink Pineapple Mealybug and Survey of Insect Pests on Pineapple	68

Short Communications

Yong-Min Li, Pi-Chuan Liou, and Chung-Rey Yen	Study on Fruit Development of Chempedak [*Artocarpus integer* (Thumb.) Merrill]	77
Chun-Jen Chen, Ming-Hwi Yao, Hsuan-Ping Chen, and Fang-Ching Liao	Establishing an Evaluation System for Food Production: A Case Study on Rice Production	84

Number 2

Research Articles

Chien-Chung Chen, Ling-Lan Cheng, Yaw-Jen Dong, Chiu-Tung Lu, Wen-Jer Wu, and John S. Yaninek	Using the Green Lacewing *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae) to Control *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae) on Papaya in a Screenhouse	91
Shu-Pei Chen, Jen-Yu Wong, and Wen-Jer Wu	A List of Chionaspinae (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea: Diaspididae) Deposited in the Insect Collection of Taiwan Agricultural Research Institute	105
Tzu-Che Lin, Wei-Ting Liu, Kuo-Yi Huang, Jih-Min Sung, Charang-Pei Li, Dong-Hong Wu, and Ming-Hsin Lai	Study on Changes of Grain Shape of Rice Cultivar ‘TNG67’ during Filling Stage by Image Analysis	122
Shu-Pei Chen, Jen-Yu Wong, and Wen-Jer Wu	Armored Scale Insects (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) Intercepted from Imported Plant Products to Taiwan	129

Chia-Hsin Tsai, Pao-Jen Ann, Yun-Sheng Lu, Mei-De Chen, Shu-Ling Hwang, and Yu-Hua Peng	Occurrence of Bacterial Leaf Spot of Tomato Caused by *Pseudomonas cichorii* in Taiwan	143
Cheng-Ping Kuan, Yen-Hua Huang, Ching-Shan Tseng, Tsung-Chun Lin, and Hsin-Der Shih	Evaluation of Real-time PCR Assay for Detection of *Didymella bryoniae*	151
Shu-Chin Lo and Pei-En Chung	An Improved Ultra Performance Liquid Chromatography Method for Analyzing Lutein Content of Vegetables in Taiwan	159
Chia-Hui Tang, Meng-Hsun Tsai, Hui-Wen Tsai, and Ching-San Kuan	A New Variety of Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] 'TN21 Golden'	167

Number 3

Research Articles

Edward Yun Cheng, Chih-Hsien Wang, Yu-Bing Huang, and Ming-Yao Chiang	The Quantitative Genetics of Prescutellar Bristles in Melon Fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)	179
Chi-Feng Lee	Revision of the Genus *Sangariola* Jacobson (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini)	188
Shu-Chin Lo and Pei-En Chung	Cloning and Functional Expression of Cinnamate 4-hydroxylase Gene from *Angelica dahurica* (Bai Zhi) and Producing 8-hydroxybergapten in Yesat	205
Wei-Sung Li, Yun-Sheng Lue, Tsung-Yen Wu, Shwu-Jene Tsai, and Mei-Hsing Chen	Domestication of Native *Lepista sordida* (Fr.) Singer in Taiwan	216
Shao-Kuo Liu and Guang-Jauh Shieh	Genetic Analysis on the Yield and Agronomic Characters of Super-Sweet Corn (*Zea mays* L.)	225
Kai-Hsun Hsieh, Su-Ju Lin, and Yong-Pei Wu	Genetic Diversity of Zingiberaceae Crop	235

Short Communications

Yaw-Jen Dong and Chien-Chung Chen	Study on Water Resistance and Persistence of Trapping Effectiveness of an Oriental Fruit Fly Dry-Form Bait	249
Chao-Chia Huang, Huei-Suei Huang, and Chin-Yu Tsai	Effect of Simulated Marine Shipment to Japan on the Quality of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' Plants with Spikes	253

Number 4

Research Articles

Cheng-Ping Kuan, Ching-Shan Tseng, Wen-Shiue Chang, Hsin-Der Shih, Ying-Huey Cheng, and Ting-Ching Deng	A DNA Probing System for the Detection of *Cucurbit Chlorotic Yellows Virus*	259
Pao-Jen Ann, Jyh-Nong Tsai, and Ien-Tien Wang	Mating Type Distribution of *Phytophthora palmivora* from Papaya in Taiwan	267
Lih-Ling Chern, Pao-Jen Ann, Jiunn-Feng Su, Cheng-Wei Yang, Hsing-Chun Tsay, Jyh-Nong Tsai, and Ting-Fang Hsieh	Screening of Chemicals for Control of Seedling Blight of Malabar Chestnut in Taiwan	274
Ting-Chin Deng, Yi-Ting Lin, Chin-HuiTsai, Jye-Yann Liao, and Ruei-Lung Kao	Comparative Characterization of Two isolates of *Broad bean wilt virus* 2 Infecting Yams (*Dioscorea* spp) in Taiwan	282

Ching-Shan Tseng, Sen-Ju Chen, Cheng-Ping Kuan, Yuan-Kai Tu, Hang-Wei Chen, and Min-Tze Wu	Applications of RFID Technology for Transgenic Crops Biosafety Management	291
Chieh-Wei Kuo, Su-Chen Kuo, Yu-Chia Hsu, and Yong-Pei Wu	Assessment of the Feasibility in Selecting High-Quality Rice Lines under Organic Cultivation System	298
Yi-Wen Wang, Hui-Chen Lai, Hsiao-Ying Hsieh, Chang-Sheng Wang, and Da-Gin Lin	Expression, Evaluation and Application of Novel Green Fluorescent Protein Genes, *AcGFP* and *ZsGFP*, in Rice	307

Short Communication

Ien-Chie Wen and Ching-Yi Chang	Breeding of Peach Cultivar ‘Tainung No.4 (Ruby)’	320

台 灣 農 業 研 究

作者索引

Bezděk, Jan	1
Yaninek, John S.	91
王志賢	179
王怡雯	307
王姻婷	267
王益真	17
王婉伶	43
王強生	307
石信德	151, 259
安寶貞	143, 267, 274
江明耀	179
吳文哲	91, 105, 129
吳永培	235, 298
吳宗諺	216
吳明哲	291
吳東鴻	122
呂秀英	30
呂昀陞	143, 216
呂椿棠	30
宋濟民	122
李永民	77
李奇峰	1, 188
李長沛	122
李雅琳	17
李瑋崧	216
杜元凱	291
卓緯玄	30
官青杉	167
林士閎	30
林大鈞	307
林宗俊	151
林羿廷	282
林素汝	235
林資哲	122
林靜宜	8
姚銘輝	84
唐佳惠	167
翁振宇	105, 129
高瑞隆	282
張仁育	43
張文學	259
張哲瑋	43
張靜誼	320
莊曜駿	17
許育嘉	298
郭介煒	298
郭素真	298
陳俊仁	84
陳冠文	57
陳宣蘋	84
陳美杏	216
陳美德	143
陳健忠	91, 249
陳涵葳	291
陳淑佩	105, 129
陳森車	291
陳德旭	17
陳麗鈴	274
彭玉花	143
曾清山	151, 259, 291
黃守宏	68
黃彥華	151
黃國益	122
黃淑苓	143
黃毓斌	179

黃肇家	253
黃慧穗	253
楊正偉	274
楊正釧	17
溫英杰	320
董耀仁	91, 249
廖吉彥	282
廖芳瑾	84
劉威廷	122
劉茂南	43
劉紹國	225
劉碧鵑	77
蔡志濃	267, 274
蔡佳欣	143
蔡孟勳	167
蔡幸君	274
蔡金玉	253
蔡淑珍	216
蔡惠文	167
蔡錦慧	282
鄧汀欽	259, 282
鄭允	179
鄭玲蘭	91
鄭櫻慧	259
盧秋通	91
蕭翌柱	57
賴明信	122
賴慧真	307
謝光照	225
謝廷芳	274
謝凱勛	235
謝曉鶯	307
謝靜敏	17
鍾佩恩	159, 205
顏昌瑞	43, 77
羅淑卿	159, 205
關政平	151, 259, 291
蘇俊峯	274

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Authors Index

Ann, Pao-Jen 143, 267, 274
Bezděk, Jan 1
Chang, Ching-Yi 320
Chang, Jen-Yu 43
Chang, Jer-Way 43
Chang, Wen-Shiue 259
Chen, Chien-Chung 91, 249
Chen, Chun-Jen 84
Chen, De-Shiu 17
Chen, Guan-Wen 57
Chen, Hang-Wei 291
Chen, Hsuan-Ping 84
Chen, Mei-De 143
Chen, Mei-Hsing 216
Chen, Sen-Ju 291
Chen, Shu-Pei 105, 129
Cheng, Edward Yun 179
Cheng, Ling-Lan 91
Cheng, Ying-Huey 259
Chern, Lih-Ling 274
Chiang, Ming-Yao 179
Chuang, Yao-Chun 17
Chung, Pei-En 159, 205
Deng, Ting-Ching 259, 282
Dong, Yaw-Jen 91, 249
Hsieh, Ching-Ming 17
Hsieh, Hsiao-Ying 307
Hsieh, Kai-Hsun 235
Hsieh, Ting-Fang 274
Hsu, Yu-Chia 298
Huang, Chao-Chia 253
Huang, Huei-Suei 253
Huang, Kuo-Yi 122
Huang, Shou-Horng 68
Huang, Yen-Hua 151
Huang, Yu-Bing 179
Hwang, Shu-Ling 143
Jwo, Woei-Shyuan 30
Kao, Ruei-Lung 282
Kuan, Cheng-Ping 151, 259, 291
Kuan, Ching-San 167
Kuo, Chieh-Wei 298
Kuo, Su-Chen 298
Lai, Hui-Chen 307
Lai, Ming-Hsin 122
Lee, Chi-Feng 1, 188
Lee, Ya-Lin 17
Li, Charang-Pei 122
Li, Wei-Sung 216
Li, Yong-Min 77
Liao, Fang-Ching 84
Liao, Jye-Yann 282
Lin, Ching-Yi 68
Lin, Da-Gin 307
Lin, Shih-Hong 30
Lin, Su-Ju 235
Lin, Tsung-Chun 151
Lin, Tzu-Che 122
Lin, Yi-Ting 282
Liou, Pi-Chuan 77
Liu, Mau-Nan 43
Liu, Shao-Kuo 225

Liu, Wei-Ting 122
Lo, Shu-Chin 159, 205
Lu, Chiu-Tung 91
Lu, Chun-Tang 30
Lu, Hsiu-Ying 30
Lue, Yun-Sheng 143, 216
Peng, Yu-Hua 143
Shiau, Yih-Juh 57
Shieh, Guang-Jauh 225
Shih, Hsin-Der 151, 259
Su, Jiunn-Feng 274
Sung, Jih-Min 122
Tang, Chia-Hui 167
Tsai, Chia-Hsin 143
Tsai, Chin-Hui 282
Tsai, Chin-Yu 253
Tsai, Hui-Wen 167
Tsai, Jyh-Nong 267, 274
Tsai, Meng-Hsun 167
Tsai, Shwu-Jene 216
Tsay, Hsing-Chun 274
Tseng, Ching-Shan 151, 259, 291
Tu, Yuan-Kai 291
Wang, Chang-Sheng 307
Wang, Chih-Hsien 179
Wang, Eugene I-Chen 17
Wang, Ien-Tien 267
Wang, Wan-Ling 43
Wang, Yi-Wen 307
Wen, Ien-Chie 320
Wong, Jen-Yu 105, 129
Wu, Dong-Hong 122
Wu, Min-Tze 291
Wu, Tsung-Yen 216
Wu, Wen-Jer 91, 105, 129
Wu, Yong-Pei 235, 298
Yang, Cheng-Wei 274
Yang, Jeng-Chuann 17
Yaninek, John S. 91
Yao, Ming-Hwi 84
Yen, Chung-Ruey 43, 77

台 灣 農 業 研 究

關鍵詞索引

一次枝梗	122
小果種苦茶籽油	17
小波羅蜜	77
不溶質	320
中胸背板剛毛	179
內囊骨片	1
分布	68
分類學	1, 188
反轉錄聚合酶鏈式反應	282
引子對	282
木瓜	91, 267
水稻	84, 122, 298, 307
台農21號	167
台農67號	122
台灣	43, 129
玉荷包	43
瓜實蠅	179
瓜類褪綠黃化病毒 (CCYV)	259
生育度數	30
生育速率	30
生物安全	291
生物防治	91
白芷	205
全互交	225
地理資訊系統	84
有效積溫	30
有機栽培	298
百合	188
西瓜蔓枯病	151
低酸	320
低需冷性	320
作物模式	84
沙坑	43
育種	167
豆類病毒屬	282
防治	68
東方果實蠅	249
果實蠅防治	249
油脂品質	17
油脂氧化安定性	17
炒培	17
花梗	253
花臉香蘑	216
表現系統	307
金花蟲	1, 188
疫病	274
疫病菌	267
盆花壽命	253
相對生長速率	77
盾介殼蟲	105, 129
突變品系	298
耐雨性	249
害蟲綜合管理	249
核苷酸序列	282
核酸探針	259
氣候變遷	84
草莓	57
荔枝育種	43
配對型	267
馬拉巴栗	274
啟動子	307
基因作用效應	225
基因轉殖作物	291
基徵草蛉	91

堆肥 216
淹沒式釋放 91
細胞酵素 P450 205
細菌性葉斑病 143
細菌性葉斑病菌 143
報導基因 307
植物玻璃質化溶液2 57
無線射頻辨識 291
番茄 143
絕對生長速率 77
診斷技術 151
超低溫冷凍保存 57
超高壓液相層析儀 159
超甜玉米 225
進口植物農產品 129
黃金鳳梨 167
黑葉 43
填充溶液 57
葉黃素 159
農桿菌媒介轉形 307
農業試驗所 105
預測誤差 30
馴化 216
滲透壓保護 57
種仁殼 17
綠螢光基因 307
餌劑 249
鳳梨 68
鳳梨嫡粉介殼蟲 68
影像分析 122
數量策略 179
數量遺傳分析 179
模擬海運 253
稻熱病 298
穀粒充實期 122
線性回歸模式 30
蔬菜 159
蝴蝶蘭 253
親緣分析 282
遺傳介量 225
遺傳歧異度 235
館藏標本 105
檢疫害蟲 129
檢測 259
薑黃 235
簡單序列重複區間 (ISSR) 235
藥劑防治 274
藥劑篩選 143
神澤氏葉蟎 91

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Key words Index

Absolute growth rate 77
Agrobacterium mediated transformation 307
Agrochemical screening 143
Angelica dahurica 205
Bacterial leaf spot 143
Bactrocera cucurbitae 179
Bactrocera dorslais 249
Bait 249
Biological control 91
Biosafety 291
Breeding 167
Camellia tenuifolia seed oil 17
CCYV 259
Chemical control 274
Chempedak 77
Chionaspinae (Diaspididae) 105
Cinnamate 4-hydroxylase 205
Climate change 84
Coccoidea 129
Compost 216
Control 68
Crop model 84
Cryopreservation 57
Cucurbit chlorotic yellows virus 259
Curcuma longa L. (turmeric) 235
Cytochrome P450 205
Detection 151, 259
Development rate 30
Diallel cross 225
Didymella bryoniae 151
Distribution 68
Domestication 216
Effective accumulated temperature 30
Endophallic sclerites 1
Expression system 307
Fabavirus 282
Flea beetle 188
Fragaria × *ananassa* Duch 57
Fruit fly control 249
Gene effects 225
Genetic components 225
Genetic diversity 235
Geography information system (GIS) 84
Golden pineapple 167
Grain filling stage 122
Green fluorescent protein gene 307
Growing degree days 30
Gummy stem blight 151
Hak Ip litchi 43
Image analysis 122
Imported agricultural products 129
Integrated pest management 249
Inter-simple sequence repeat (ISSR) 235
Inundative release 91
Leaf beetles 1
Lepista sordida 216
Lilium 188
Linear regression model 30
Litchi breeding 43
Loading solution 57
Longevity of the spike 253
Low-chill 320

Lutein 159
Malabar chestnut 274
Mallada basalis 91
Marine shipment simulation 253
Mating type 267
Mutant line 298
Non-melting 320
Nucleic acid probe 259
Nucleotide sequence 282
Oil oxidative stability 17
Oil quality 17
Organic cultivation 298
Osmoprotection 57
Papaya 91, 267
Phalaenopsis 253
Phylogenetic analysis 282
Phytophthora diseases 274
Phytophthora palmivora 267, 274
Pineapple 68
Pink pineapple mealybug 68
Plant Vitrification Solution 2 57
Predictive error 30
Prescutellar bristles 179
Primary branches 122
Primer 282
Promoter 307
Pseudomonas cichorii 143
Quantitative genetic analysis 179
Quantitative trait 179
Quarantine pest 129
Radiofrequency identification 291
Real-time PCR 151
Relative growth rate 77
Reporter 307
Rice 122, 298, 307
Rice (*Oryza sativa* L.) 84
Rice blast disease 298
Roasting 17
RT-PCR 282
Sah Keng litchi 43
Shell 17
Slide-mounted specimens 105
Spike 253
Subacid 320
Super sweet corn 225
Taiwan 43, 129
Taiwan Agricultural Research Institute (TARI) 105
Taxonomy 1, 188
Tetranychus kanzawai 91
TN21 167
TNG67 122
Tomato 143
Transgenic crops 291
Ultra performance liquid chromatography 159
Vegetables 159
Water resistance 249
Yu Her Pau litchi 43

台灣農業研究　評閱者名單

第 63 卷 (2014)

王升陽
國立中興大學森林學系

申雍
國立中興大學土壤環境科學系

石信德
農業試驗所植物病理組

朱燕華
財團法人食品工業發展研究所

江昭皚
國立台灣大學生物產業機電工程系

吳文哲
國立台灣大學昆蟲學系暨研究所

李堂察
國立嘉義大學園藝學系暨研究所

李敏惠
國立中興大學植物病理學系

林明瑩
台南區農業改良場

林俊隆
國立中興大學農藝學系

林聖泉
國立中興大學生物產業機電工程學系

施昭彰
農業試驗所作物組

施劍鎣
國立中興大學昆蟲學系

柯文雄
國立中興大學植物病理學系

柯俊成
國立台灣大學昆蟲學系暨研究所

胡仲祺
國立中興大學生物科技學研究所

胡澤寬
國立中興大學農藝學系

高景輝
國立台灣大學農藝學系

張哲瑋
農業試驗所嘉義分所園藝系

張素貞
苗栗區農業改良場

張雅君
國立台灣大學植物病理與微生物學系

張慧羽
國立台灣大學昆蟲學系暨研究所

莊益源
國立中興大學昆蟲學系

郭章信
國立嘉義大學生物資源學系

郭寶錚
國立中興大學農藝學系

陳良築
國立中興大學分子生物學研究所

陳京城
國立中興大學園藝學系

陳宗祺
亞洲大學生物科技學系

陳宗禮
國立中興大學農藝學系

陳金枝
農業試驗所植物病理組

陳昭瑩
國立台灣大學植物病理與微生物學系

陳凱儀
國立台灣大學農藝學系

曾國欽
國立中興大學植物病理學系

黃文理
國立嘉義大學農藝學系

黃文達
國立台灣大學農藝學系

楊正澤
國立中興大學昆蟲學系

溫宏治
國立台灣大學植物醫學系

葉信宏
中央研究院農業生物科技研究中心

鄔宏潘
中央研究院植物暨微生物學研究所

劉瑞芬
國立台灣大學植物病理與微生物學系

蔡新聲
朝陽科技大學生化科技研究所

鄧文玲
國立中興大學植物病理學系

鄭明倫
國立自然科學博物館

蕭文鳳
國立嘉義大學植物醫學系

蕭旭峰
國立台灣大學昆蟲學系暨研究所

戴廷恩
農業試驗所花卉研究中心

鍾文鑫
國立中興大學植物病理學系

顏昌瑞
國立屏東科技大學農園生產系

顏國欽
國立中興大學食品暨應用生物科技學系

關政平
農業試驗所生物技術組

蘇正德
東海大學食品科學系

蘇宗宏
國立中興大學昆蟲學系

Reviewers, Journal of Taiwan Agricultural Research
Volume 63, 2014

Chang, Hwei-Yu
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Chang, Jer-Way
Department of Horticulture, Chiayi Agricultural Experiment Station

Chang, Su-Jein
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Chang, Ya-Chun
Department of Plant Pathelogy and Microbiology, National Taiwan University

Chen, Chao-Ying
Department of Plant Pathelogy and Microbiology, National Taiwan University

Chen, Chin-Chih
Division of Plant Pathology,Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Ching-Cheng
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Kai-Yi
Department of Agronomy, National Taiwan University

Chen, Liang-Jwu
Graduate Institute of Molecular Biology,National Chung Hsing University

Chen, Tsung-Chi
Department of Biotechnology, Asia University

Chu, Yen-Hua
Food Industry Research and Development Institute

Chuang, Yi-Yuan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Dai, Ting-En
Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute

Deng, Wen-Ling
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Hsiao, Wen-Feng
Department of Plant Medicine, National Chiayi University

Hu, Chung-Chi
Graduate Institute of Biotechnology, National Chung Hsing University

Hu, Tzer-Kaun
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Huang, Wen-Dar
Department of Agronomy, National Taiwan University

Huang, Wen-Li
Department of Agronomy, National Chiayi University

Jeng, Ming-Luen
National Museum of Natural Science

Jiang, Joe-Air
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Ko, Wen-Hsiung
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Kuan, Cheng-Ping
Division of Biotechnology,Taiwan Agricultural Research Institute

Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Kuo, Chang-Hsin
Department of Biological Resources, National Chiayi University

Lee, Miin-Huey
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Lee, Tan-Cha
Department of Horticulture Science & Graduate Institute of Horticultural, National Chiayi University

Lin, Jyun-Long
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Lin, Ming-Ying
Tainan District Agricultural Research and Extension Station

Lin, Tshen-Chan
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Chung Hsing University

Liou, Ruey-Fen
Department of Plant Pathelogy and Microbiology, National Taiwan University

Shen, Yuan
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Shiao, Shiuh-Feng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Shih, Chain-Ing
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Shih, Hsin-Der
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Shih, Jau-Chang
Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute

Su, Jeng-De
Department of Food Science, Tunghai University

Su, Tsong-Hong
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Tsay, Hsin-Sheng
Graduate Institute of Biochemical Sci. & Technol., Chaoyang University of Technology

Tzeng, Kuo-Ching
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Wang, Sheng-Yang
Department of Forestry, National Chung Hsing University

Wen, Hung-Chich
Master Program for Plant Medicine, National Taiwan University

Wu, Hung-Pan
Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica

Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Yeh, Hsin-Hung
Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica

Yen, Chung-Ruey
Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology

Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

「台灣農業研究」稿約

一、 本刊為行政院農業委員會農業試驗所發行之學術性期刊 (季刊)，刊登國內、外農業試驗研究相關之研究稿件：

專題論述：由本所期刊編審會邀請專家撰寫。

研究報告：關於農業科學未曾發表之研究報告，按題目、作者、摘要、前言、材料與方法、結果、討論、結論 (一般略去，或併入討論)、誌謝 (可略去)、引用文獻等依序撰寫，表與圖附於其後，全文以不超過10印刷頁為原則。其中，'結果'與'討論'如有必要，可合併成'結果與討論'。

研究簡報：關於農業科學未曾發表之簡短原始研究報告，不須分章節撰寫(可參照研究報告次序)，但須附中英文摘要，全文以不超過4印刷頁為原則。

二、 稿件應以中文或英文撰寫，以文書軟體MS WORD®格式儲存成檔案 (檔案類型以Word 97-2003或以上版本文件為佳)。文稿以A4大小 (長29.6公分，寬21公分) 兩倍行高 (double space) 繕打，加行號，12號字體，左邊對齊，版面應預留上下3公分，左右2公分之空間，並自第二頁起在右下角以阿拉伯數字註明頁數。撰寫時，中文以細明體、英文以Times New Roman字體打字；英文字距及句距皆一字節。

三、 投稿者在本刊線上投審系統首頁點選'投稿者區域'，在一般稿件提交區點選'作者提交新稿件'進入，確認及點選稿件已依照稿約撰寫無誤後，下一步即填寫稿件資料，務請填寫封面信函，再依序填寫作者資料、上傳檔案及確認提交。本刊線上投審系統僅接受一位通訊作者，稿件如有多位通訊作者，務請註明於封面信函中，否則不受理，本刊將於稿件接受刊登後逕予加註多位通訊作者。

四、 稿件格式：

題　目：宜簡短，能充分反應文旨，並附簡題 (Running title) (中文12字；英文6字以內為原則)。英文題目除介系詞、連接詞等字外，每字第一字母應大寫。報告如有機關所屬編號，請列於誌謝。

作　者：作者姓名置中，作者二人或二人以上時，以中文一全形空格間隔之；英文姓名則名在前姓氏在後，作者二人或二人以上時，以 " , " 相隔，最後一人前加 "and" 字樣，其表示方法如Chen-Seng Huang, Chen-Chang Chen, and Chyr-Guan Chen。每一作者須附小註，以說明所屬機關單位與職稱，通訊作者附予星號" * "，並須附電子郵件信箱。題目與作者同置第一頁。

摘　要：不分段落、宜簡潔明確。摘要之前應加作者、年代、題目、期刊、及卷期，摘要之後應附關鍵詞 (Key words)，關鍵詞不超過五個，每個英文關鍵詞第一字母應大寫。摘要以不超過五百字為原則。以中 (英) 文發表者須附英 (中) 文摘要，置於本文之後，且內容須與中 (英) 文摘要相符，並附通訊作者、作者之小註。

本　文：依序為前言 (INTRODUCTION)、材料與方法 (MATERIALS AND METHODS)、結果 (RESULTS)、討論 (DISCUSSION)、結論 (CONCLUSIONS)、誌謝 (ACKNOWLEDGMENTS)、引用文獻 (REFERENCES)。除學名、專有名詞、化學式、數學公式、數字、度量衡單位及縮寫外，文句中不得中外文並用，需使用英 (外) 文以助明瞭時，須將英 (外) 文括號置於中文之後。材料與方法、結果兩部份如有必要須分段 (節)，每一段內並可再分小段，以助明瞭文稿內容。各段題目 (heading) 單行置於該段之前，小段題目 (subheading) 直接置於小段之首。如因結果繁複不易聯接討論，可

合併成‘結果與討論 (RESULTS AND DISCUSSION)’。

表　　格：

1. 每一表格應分別繕製，須以MS WORD®中 “表格” 工具製作，上方須有標題，以句點結尾，並按文中出現順序加上**表1. (Table 1.)**，**表2. (Table 2.)** 等冠號。
2. 中文稿之表格標題應中英文並列，冠號與表幅齊頭，表內項目及內容以英文書寫。英文標題及各欄英文細目，除第一字之第一字母大寫外，餘均小寫。單位使用SI units (如 $g\ L^{-1}$、$Mg\ ha^{-1}$)，一律單數、英文字母。
3. 表格應加分析、簡化與歸納後始可列表。每一表格應在文中標示清楚，以便對照，且每一表格應單頁製作。
4. 表中內容如需說明，均須附加小註，以z, y, x,…等縮小小寫字母置於右上角，並於表下依次敘述。表格僅列橫線。星號“* (5%顯著性水準)”、“** (1%顯著性水準)”保留統計顯著性使用。
5. 性質類同之圖與表，務請精簡與合併。

圖　　片：

1. 手繪圖版以黑色墨水於白色紙上分別繪製，掃描後存成JPG電子檔 (或JPEG電子檔) 上傳。如以電腦繪圖，力求清晰，亦存成JPG檔 (或JPEG檔) 上傳，或直接貼於本文之後。請勿使用MS Office內建軟體繪圖，建議使用專業繪圖軟體 (如Sigma Plot) 繪製。
2. 圖中所有標示應以英文書寫 (Arial字型) 或註明於標題之後小標一律以(A), (B), (C),......編號，分類學則可以1, 2, 3,......標示。
3. 照片以光面紙為原則，清晰度以縮小50%可判讀為宜。多幅照片儘量製成併版；如有特別指明，應加圈或箭頭表明。顯微照相，應加比例尺大小；照片大小以不超過版面 (25 cm × 18 cm) 為宜，掃描後存成JPG檔 (或JPEG檔) 上傳，解析度300 dpi或以上，並直接貼於本文之後。
4. 圖版及照片應有標題，並按文中出現的順序加上**圖1. (Fig. 1)**、**圖2. (Fig. 2)** 等冠號，在文中須標示清楚，以便對照。中文稿標題應中英文併列，英文稿標題以英文書寫即可，力求明確。
5. 除併圖外，每一圖片應單頁製作。

誌　　謝：不分段落，包括人物、經費來源、報告之機關賦予編號等。誌謝可略去。

引用文獻：

1. 列舉確實曾引用之文獻。文獻以登載於學術性期刊、書籍、研討會之文章及學位論文為限 (不含推廣報告)，如引用網路學術性報告，須加註瀏覽、下載日期及網址路徑。文中涉及引用文獻時，根據該文獻的作者與年代加以括號：如 (Sung 1991)、(Lo 1991, 1992)、(Chen & Ho 1983)、(Sung 1991; Hsu *et al*. 1992)，以年代先後為序置於引用文處。
2. 文獻一律以英文撰寫，以姓名字母為序。作者相同時以年代先後為序。
3. 文獻之書寫方法以期刊為例，依序為作者、年代、題目、期刊、卷數、頁數。在每卷每期之頁碼都從數字 1開始的期刊，才必須加上期數。
4. 期刊名須依該期刊公告之縮寫撰寫；如無者，請參照Biosciences Information Service (1992) 出版之 “Serial Sources for the BIOSIS Previews Database” 或依該學術領域之慣例撰寫。

5. 文獻書寫範例如下：

(1) 原中文報告引用文獻出自學術性期刊

Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. China 157:34–43. (in Chinese with English abstract)

(2) 原中文報告引用文獻出自著作性書籍

Sung, J. M. 1991. Nitrogen Metabolism of Rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)

(3) 原中文報告引用文獻出自編輯性書籍

Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1–12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung. 252 pp. (in Chinese with English abstract)

(4) 原中文報告引用文獻出自研討會專刊

Chang, C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passion fruit in Taiwan. p.31–38. *in*: Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. November 24, 2001. Taichung, Taiwan.Taiwan Phytopathol. Soc. Publ., Taichung. (in Chinese with English abstract)

(5) 原報告引用文獻出自特定網頁資料

Lehtomäki, A. 2006. Biogas production from energy crops and crop residues. Jyväskylä Stud. Biol. Environ. Sci. 163. Univ. of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland. https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/13152/9513925595.pdf (visited on 12/16/2014)

五、 單位、縮寫格式、括號及統計分析

1.凡文中出現之數值，除非另有特別之意義，一律用阿拉伯數字書寫。數字在句首之英文稿，改以文字表示。單位則用國際公認標準符號 (SI units) 代替全文，各常用之縮寫單位參照說明如下：

(1) 長度：公里 (km)、公尺 (= 米) (m)、公分 (= 厘米) (cm)、公釐 (= 毫米) (mm)、微米 (μm)。

(2) 重量 (W)：公噸 (Mg)、公斤 (kg)、公克 (g)、毫克 (mg)、微克 (μg)。

(3) 容積 (V)：公升 (L)、公撮 (= 毫升) (mL)、微升 (μL)。

(4) 面積：公頃 (ha)、平方公尺 (m^2)、平方公分 (cm^2)。

(5) 溫度：攝氏 (℃)、絕對溫度 (K，但須加以說明)。

(6) 時間：日 (天) (d)、時 (h)、分 (min)、秒 (s)。

(7) 濃度：莫耳 (M)、千分之一莫耳 (mM)、當量 (N)、千分之一當量 (mN)。

(8) 重力加速度：*g*。

(9) 分子量: kDa。

(10) 肥料三要素: 如以肥料種類$N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$，如以元素N-P-K。

2.其他之縮寫：平均 (*avg*.)、大約 (*ca*.)、直徑 (diam.)。

3.括號：括號字型全以半形 ( )，括號前後各空一格。

4.統計分析：達顯著性水準以*、**或處理間顯著差異區分，以a、b、c、…表示者均應加註顯著機率值*P* (例如$P < 0.01$)；各統計量請採慣用符號，例如相關係數 (r) 、決定係數 (R^2)、變異係數 (cv)、標準差 (sd)、平均值標準差 (se) 等。

5.其他問題：

(1) 單位與其前面數值之間應空一格，如220 g。

(2) 數學運算符號與其前後數值之間應各空一格，如P = 0.014、23.6 ± 3.0、15 × 2。

(3) 在 ±、× 或to的前後兩數值若是含有單位，請用23.6% ± 3.0%、15 cm × 2 cm、20℃ to 30℃ (即勿省略前面數值之單位)。

(4) 數值起迄符號用– (半型破折號；EN Dash)，勿用 ~ 或 -，且與前後兩數值之間無須留空格，如3–6、2005–2007年、7月20–25日。

(5) 年代一律用西元。

(6) 濃度與容量單位使用mg L^{-1} (勿用ppm)。

(7) 轉速單位使用× *g* (勿用rpm)。

六、 其他注意事項

1. 本刊採網路線上投審，來稿請至本刊線上投審系統網址 (http://aspers.airiti.com/Aspers/WebHome.aspx)進行投稿作業，投稿前務請詳閱稿約及投稿須知，並可參閱最新一期報告。
2. 生物學名以斜體字表示，屬名第一字母大寫。學名於摘要、本文、每一圖表中第一次出現時，須寫全名，如*Citrus sinensis*；第二次出現時，屬名保留第一字母後加句點 “.”，種名全寫，如*C. sinensis*。生物學名於本文中首次出現時應加註命名者。
3. 中文稿件中，外文名詞應儘量翻譯成中文，若是不常見名詞應於文中第一次出現時以括號標出原文。摘要及本文中，英文縮寫於第一次出現時，須附全名。
4. 農作物品種名須加上單引號，中文用「 」(如水稻「台稉9號」、木瓜「台農2號」)，英文用‘’ (如rice ‘TK9’, papaya ‘TNG2’)。

七、 投稿方式

1. 稿件內容務須依照上列規定格式書寫及線上投稿，本期刊編審會保有修改與退稿之權利。文稿經本期刊接受後，由作者負責前二校。除筆誤與錯字外，作者在校稿時，不得擅自更改內容與數據。
2. 投稿前請詳閱稿約及參見最一期刊登報告，投審稿件程序請上網參閱本期刊網址：http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042。

八、 投稿本期刊之稿件，不得投稿其他刊物。稿件經本期刊接受後，刊登權屬發行單位農業試驗所所有，非經本所書面同意，不得轉載或移轉他處發表。本刊具專屬版權，恕不受理一稿兩投之文章(已刊載或投寄國內外有版權刊物之文章，請勿再投稿本刊)。若有上述情事除依相關法律處理責由作者自負外，本刊將列入紀錄永不受理其投稿。

九、 其他未盡事宜本期刊得隨時修正或補充。

Instructions to Authors

Journal of Taiwan Agricultural Research (revised on 18 January 2013)

General Information

The *Journal of Taiwan Agricultural Research* (JTAR) is published four issues annually by the Taiwan Agricultural Research Institute (TARI). Researchers and scientists willing to make the contribution in the fields of agricultural development by publishing their full papers of original research, reviews, or short communications in the Journal are highly welcome and appreciated. Research staff affiliated with TARI is not a requirement for publishing in JTAR. All manuscripts should be submitted online at the Journal's website, http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042. Follow its instructions. Submissions to JTAR must not simultaneously submit to any other scientific or technical journal.

Scope

After critical review and approval by the editorial board, JTAR publishes articles in plant science; biotechnology; agricultural chemistry; plant protection; agricultural engineering; agricultural economics and extension; industrial strategic management; biostatistics; and bioinformatics. Articles reporting experimentation or research findings in these fields will be peer-reviewed as research articles. Short articles (no more than 4 pages) concerned with experimental techniques, results, or unique phenomena will be peer-reviewed as short communications. Review articles will be under invitation by the editorial board of JTAR.

Style

See the latest issue of JTAR for style and layout. General rules are as follows:

- All abbreviations should be defined at the first mention and in tables and figures, and be used throughout the entire article.
- The Latin names of organisms (e.g., plants, pathogens, insects and pests) must always list when appeared at first appearance (in Abstract or text). Give the complete binomial and authorities.
- At first listing both the common and chemical names of pesticides must be given.
- SI units must be used in the manuscript.
- Use the 24-h time system (e.g., 0200 and 1400) and abbreviate dates such as 3 October 2012 or 10/03/2012.
- Except when used with units, spell out numbers one through nine. Put commas for the decimal separator (e.g., 1,356,078 and 6,078) and place a zero before the decimal point (e.g., 0.6078 and 0.078).

Preparation of Manuscript Files

All submitted manuscript files should write in Chinese or English and save it in Microsoft Word 97-2003 (preferred version) or later versions (.doc files or .docx files). Other word processing software is not accepted. High-resolution figure files may be included in manuscript and submitted separately in

forms of .jpg files or .doc files or .docx files, one figure per file. Do not use word processing features such as automated bulleting and numbering, head and subhead formatting, or internal linking. Text should be typed in A4 size (29.6 cm long, 21 cm wide) in double-spaced and be numbered and aligned to the left side, while tables use single-spaced. Only one font and size (font no. 12) is used. Provide the document with an upper and lower margin of 3 cm and a left and right margin of 2 cm. Starting from the second page, indicate the page number on the lower right corner. When typing the manuscript, use the font of MingLiu (細明體) for Chinese and Times New Roman for English. Leave a single space between each English word and sentence.

The author submitting the manuscript should click on "Authors" on the front page of Journal's Online Submission and Review System. Under "Author" page, click "Submit a new manuscript". Confirm submission checklist and then complete the information related to the manuscript including a cover letter. Follow the sequence and instructions to fill out and upload the information. The system accepts only one corresponding author. If the manuscript has more than one corresponding author, indicate them in the cover letter. The remaining corresponding authors will be added to the manuscript when it has been accepted.

JTAR adopts a double-blind review for all submitted manuscripts. Reviewers will be able to download the submitted files that authors upload to the system. There are three main types of articles published by JTAR, i.e., "Reviews", "Research Articles", and "Short Communications."

Reviews. A review article is invited by editors of JTAR and will be reviewed and revised to assure an appropriate style and content.

Research Articles. Write a research article according to the mentioned scope in the following sequence: title, author(s), abstract, and text. Attach tables, figure captions, and figures at the end of text. In general, each manuscript should not exceed 10 printed pages.

Short Communications. An article that has a size less than 4 printed pages concerned with experimental techniques, results, or unique phenomena may be published as a short communication when accepted.

Title. A title highlights the subject and purpose of the article briefly but clearly. Use common names of crops, avoid abbreviations, and limit words where possible. Except prepositions and connectives, capitalize each word in the English title. Write down the suggested running title, with no more than twelve Chinese characters or six English words, in the next sentence.

Author. List names of all authors below the title and place an asterisk after the corresponding author. The next sentence lists professional titles, institutions and complete addresses of all authors. Provide e-mail address of the corresponding author. Place title and author(s) on the same page.

Abstract. Each article has a single self-contained paragraph, containing the rationale, objectives, methods, results, and their meaning or scope of application specifically. Identify the important details to interpret the results but try not to exceed five hundred words. Do not cite references and avoid equations. In the next sentence, include no more than five key words and capitalize the first letter of each word. If the manuscript written in Chinese (English), place English (Chinese) abstract after the main text of the manuscript.

Text. The text includes the following sections in sequence: INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSIONS (optional), ACKNOWLEDGMENTS (may be omitted), and REFERENCES. If required, combine the results and discussion section into "RESULTS AND DISCUSSION", and incorporate the conclusions into the discussion. If there is an appendix, place it before the references. Except necessary, do not mix English with other languages. If required, place headings and subheadings at the head of paragraphs of the sections MATERIALS AND METHODS and RESULTS.

Tables. Prepare tables with the tables feature of MS WORD®; do not use tab keys, space bars, or graphics boxes. Number tables consecutively with one table per page. Place tables at the end of text. Each datum needs to be contained in a defined cell. Table heads should be complete and self-contained but brief. All variables should be defined and abbreviations be spelled out in table footnotes. Follow the order of z, y, x, w, v, u,.... The *, **, and *** are used only to show statistical significance at the 0.05, 0.01, and 0.001 probability levels, respectively. Lack of significance indicates as NS. Asterisks or letters next to values indicate statistical significance and should align them in the same cell as the value. All footnotes should be set on separate lines. Capitalize only the first word in a row of the body of a table with the exception of proper nouns. Use only SI units (e.g., $\mu g\ L^{-1}$ and $Mg\ ha^{-1}$) in the singular forms.

Figures. Provide clear contrast figures in high-resolution JPG files (≧ 300 dpi) and upload them on-line as individual files and attach them after tables; one figure one page. Keep relative sizes of symbols, letters, and numbers as the original should be larger than the intended final size. Use English for letters in Arial font. Explain curves or symbols in a legend within the figure. JTAR will publish figures in black and white. Color figures, images, photos or maps are subject to the agreement of the editorial board and fee must be paid before the manuscript is published in the journal. Photographs and drawings for graphs and charts should be prepared with good contrast of dark and light and no more than the size of 25 cm × 18 cm. Use English for figure captions and separate captions for figures. A caption should be concise but given in sufficient detail. Define the crop or soil involved, the major variables presented, the place and year, and the abbreviations and symbols used in the caption. Indicate the scale for illustrations.

Acknowledgments. If required, provide it in a single paragraph. List institutional sponsors, the institutional article number, and contribution acknowledgment.

References. The reference section lists published literature and unpublished reports, theses, and dissertations cited in the manuscripts. Alphabetize the list by the surnames of the first author, followed by the other authors. Cite unpublished data, personal communications, and reports in the text only (in parentheses). Give the authors, year, complete article title, abbreviated journal title, volume number, and inclusive pages for journal articles. Give the authors, year, chapter title, pages, complete book title, book editor, publisher, and place of publication for book chapters. Add also the place and date of the conference for proceedings. For electronic references and others, see the current issues of JTAR. Single author references precede multiple-author references for the same first author. Use chronological order for references with identical authorship. Add a lowercase letter (i.e., a, b, c, etc.) to the year to identify same-year or multiple-author references for text citation. Write the author and year of the cited references inside parentheses; for example, (Chen & Ho 1983; Sung 1991; Hsu *et al.* 1992). Refer to the "Serial

Sources for the BIOSIS Previews Database" published by Biosciences Information Service (1992) for the abbreviations of an academic journal. Some reference examples:

- Reference from an academic journal written in Chinese:
  Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. Res. China 157:34–43. (in Chinese with English abstract)
- Reference from a book written in Chinese:
  Sung, J. M. 1991. Nitrogen Metabolism of Rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)
- Reference from an edited book written in Chinese:
  Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1–12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung. 252 pp. (in Chinese with English abstract)
- Reference from a proceedings written in Chinese:
  Chang, C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passion fruit in Taiwan. p.31–38. *in*: Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. Taichung, Taiwan. November 24, 2001. Taiwan Phytopathol. Soc. Publ., Taichung. (in Chinese with English abstract)
- Reference from a website:
  Lehtomäki, A. 2006. Biogas production from energy crops and crop residues. Jyväskylä Stud. Biol. Environ. Sci. 163. Univ. of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland. https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/13152/9513925595.pdf (visited on 12/16/2014)

Units, Abbreviations, and Statistical Analysis

Use the SI system (Systéme International de Unités) in JTAR. Some commonly used abbreviated units:

- Length: kilometers (km), meter (m), centimeter (cm), millimeter (mm), micrometer (μm)
- Weight (W): ton (Mg), kilogram (kg), gram (g), milligram (mg), microgram (μg)
- Volume (V): litre (L), millilitre (mL), microlitre (μL)
- Surface: hectare (ha), square meter (m^2)
- Temperature: Celsius (℃), absolute temperature (K, but must be indicated)
- Time: day (d), hour (h), minute (min), second (s)
- Concentration: mole (M), millimole (mM), normal (N), millinormal (mN)
- Gravitational acceleration: *g*
- Molecular weight: kDa
- Three macronutrients in fertilizers: element─N-P-K ; equaivalent quantity─$N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$

  Other abbreviations:
- Average: *avg*.
- Approximate: *ca*.
- Diameter: diam.
- Concentration: e.g. mg L^{-1}.
- Frequency of a rotation: ×*g*.

Statistical analysis. Manuscripts should contain enough details of experimental design so that the results can be judged for validity and repeatability. The symbols * and ** are used to show differences in statistical significance. Add P value (e.g. $P < 0.01$) when a, b, c… are used to classify statistical significance. Examples of commonly used symbols: r for correlation coefficient, R^2 for coefficient of determination, cv for coefficient of variation, sd for standard deviation, and se for standard error.

Accepted Manuscripts

When a submitted manuscript is accepted, corresponding author will receive notification from an editor or editor-in-chief, and the accepted files will be used for press. Authors are responsible for obtaining all permissions for use of materials in the manuscripts from other publishers and should notify the editor at the time the manuscript is accepted. JTAR reserves the right to publish and republish any parts submitted with a manuscript.

Plagiarism

Manuscripts may be screened for plagiarism upon submission. If there appears significant duplicate content with other sources, the manuscript will be forwarded to the journal editor for evaluation and action.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chi-Chung
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Fure-Chyi
Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Guo, Horng-Yuh
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Phathology, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture & Landscape Architecture, National Taiwan University

Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ko, Wen-Hsiung
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Lu, Hsiu-Ying
Taiwan Agricultural Research Institute

Ou, Shyi-Kuan
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Shen, Yuan
Department of Soil & Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Su, Jeng-De
Department of Food Science, Tunghai University

Tsay, Hsin-Sheng
Graduate Institute of Biochemical Sci. & Technol., Chaoyang University of Technology

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wu, Hung-Pan
Institute of Plant & Microbial Biology, Academia Sinica

Editorial Assistants

Chen, Siang-Jiun
Commission of R&D Strategy on Agric. Sci. & Technol., Taiwan Agricultural Research Institute

Lee, Miao-Jyun
Commission of R&D Strategy on Agric. Sci. & Technol., Taiwan Agricultural Research Institute

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 63 No. 3 September 30, 2014

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042
Press	Airiti Press Inc.
Address	18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330